



TITLE:

ホスホリパーゼA2とスフィンゴミ
エリナーゼの触媒機構の解明 - 酵
素反応速度論によるアプローチ(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

藤井, 忍

CITATION:

藤井, 忍. ホスホリパーゼA2とスフィンゴミエリナーゼの触媒機構の解明 - 酵素反応速度論によるアプローチ. 京都大学, 2000, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

2000-01-24

URL:

<https://doi.org/10.11501/3164189>

RIGHT:

②

ホスホリパーゼ A₂ とスフィンゴミエリナーゼの
触媒機構の解明
ー酵素反応速度論によるアプローチー

2000

藤井 忍

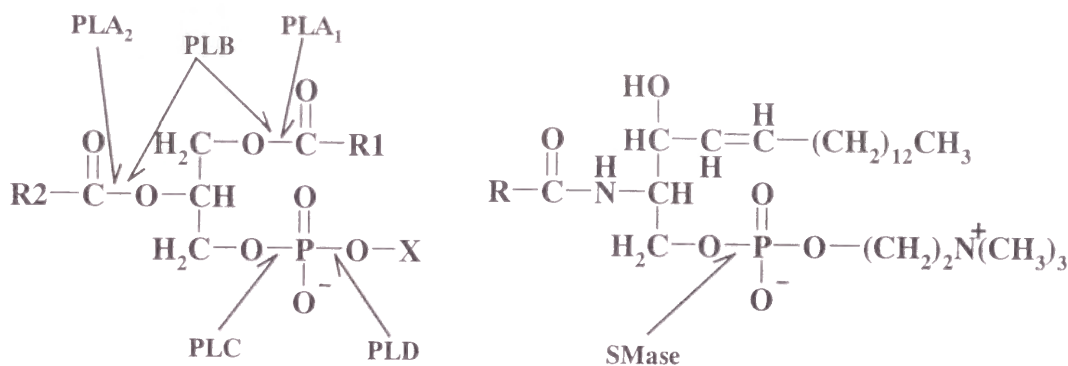
目次

緒論	1
本論	3
第一章 ホスホリパーゼ A ₂ の触媒機構の解明	3
第一節 ウシ脾臓由来ホスホリパーゼ A ₂ の触媒機構	4
-I 型と II 型 PLA ₂ の触媒機構の共通点と相違点 -	
第一項 序	4
第二項 pH 変化に対する酵素の安定性	6
第三項 BPB による触媒基 His 48 の化学修飾	7
第四項 Ca ²⁺ の結合様式	11
第五項 短鎖レシチンの加水分解反応	15
第六項 単分子分散状およびミセル状レシチンの加水分解反応におよ ぼす Ca ²⁺ の影響	17
第七項 単分子分散状およびミセル状レシチンを基質としたときの酵 素反応パラメーターの pH 依存性	19
第八項 考察	24
第二節 ホスホリパーゼ A ₂ と基質または基質アナログとの結合における Ca ²⁺ の役割	31
-I 型と II 型 PLA ₂ の結合様式の共通点と相違点 -	
第一項 序	31
第二項 真の基質と PLA ₂ との結合におよぼす Ca ²⁺ の影響	32
第三項 グリコール含有基質アナログと PLA ₂ との結合におよぼす Ca ²⁺ の影響	34
第四項 コリン含有基質アナログによる PLA ₂ の阻害	37
第五項 コリン含有基質アナログと PLA ₂ との結合におよぼす Ca ²⁺ の 影響	40
第六項 コリン含有基質アナログと PLA ₂ との結合におよぼす His 48 のプロトン化の影響	41
第七項 考察	42
第三節 マノアライドアナログによるホスホリパーゼ A ₂ 活性の阻害機構... ..	45
-PLA ₂ の種類による阻害機構の多様性 -	
第一項 序	45
第二項 MLD-analog による PLA ₂ の不活性化	46
第三項 MLD-analog による Lys 残基の化学修飾	48
第四項 MLD-analog による修飾反応に対する <i>n</i> -C ₁₂ PC の保護作用	51
第五項 考察	51

第二章 スフィンゴミエリナーゼの触媒機構の解明	56
第一節 <i>Bacillus cereus</i> 菌由来スフィンゴミエリナーゼの Mg^{2+} 結合と触媒機能	57
第一項 序.....	57
第二項 Mg^{2+} の結合様式	58
第三項 酵素の変性におよぼす Mg^{2+} の影響	60
第四項 HNP と SM の加水分解におよぼす Mg^{2+} の影響.....	62
第五項 低親和性部位に対する Mg^{2+} の結合定数の pH 依存性.....	64
第六項 HNP と SM を基質としたときの酵素反応パラメータの pH 依存性.....	65
第七項 考察.....	69
第二節 <i>Bacillus cereus</i> 菌由来スフィンゴミエリナーゼの酵素機能における Asp126 と Asp 156 の役割	71
第一項 序.....	71
第二項 変異体酵素の構造安定性.....	71
第三項 変異体酵素による短鎖スフィンゴミエリンの加水分解	72
第四項 変異体酵素と Mg^{2+} との結合	73
第五項 変異体酵素による HNP と SM を基質としたときの酵素反応パラメーターの pH 依存性.....	76
第六項 考察.....	79
結論	82
実験方法	84
第一章第一節に関する実験方法.....	84
第一章第二節に関する実験方法.....	87
第一章第三節に関する実験方法.....	89
第二章に関する実験方法.....	91
論文目録	93
謝辞	94
引用文献	95

緒論

ホスホリパーゼ（phospholipase）はリン脂質のエステル結合を加水分解する酵素の総称で，切断するエステル結合の部位によってホスホリパーゼ A_1 （ PLA_1 ）， A_2 ，B，C，およびDに分類される．また，アミノアルコールであるスフィンゴシンを基本骨格とするリン脂質スフィンゴミエリン（sphingomyeline: SM）のリン酸エステル結合を加水分解する PLC は特にスフィンゴミエリナーゼ（SMase）と呼ばれる．



リン脂質は当初，生体膜の主要構成成分として外界に対するバリアーの形成に携わるとともに，エネルギー源としての栄養素と考えられていた．そのためにホスホリパーゼ類は，爬虫類，昆虫，およびバクテリアが分泌する毒成分として生体膜を破壊する作用や栄養源として取り込まれたリン脂質を消化する作用をもつ酵素として認識されてきた．しかし，この10年間の研究の進展に伴って，ホスホリパーゼ類は動物組織や細胞内にも存在することが明らかになり，新たな分子種が数多く発見された．これらのホスホリパーゼ類により生体膜から産生されるアラキドン酸，セラミド，イノシトール-3-リン酸，ジアシルグリセロール，およびホスファチジン酸などは種々の生理活性を示し，新たな生理活性物質に変換される出発物質ともなりうる．さらに，これらの分子が細胞内情報伝達を媒介するセカンドメッセンジャーとしての役割を担うことが明らかにされるに至っては，これらの産生にかかわるホスホリパーゼ類は，単に毒成分や消化酵素としての役割にとどまらず，細胞内情報伝達における key enzyme として認識されるようになった¹⁻¹¹⁾．

ホスホリパーセ A_2 （ PLA_2 ）は食物中のリン脂質の消化あるいは生体膜リン脂質の新生と代謝に関わるとともに，プロスタグランジン類などの脂質メディエーターの産生に至るアラキドン酸カスケードの開始酵素として機能する^{4,7)}．他方，スフィンゴミエリナーゼ（SMase）の詳細な機能には不明な点が多いが，少なくとも，スフィンゴ脂質の代謝異常によって起こる Niemann-Pick 病はリソソームに存在する SMase の遺伝子の欠損に起因することが知られている¹²⁾．また，SMase の作用により産生されるセラミドは，ある種のプロテインキナーゼやホスファターゼを活性化することが報告されており，最近では，セカンドメッセンジャーとしてアポトーシスとの関連において注目を集めている⁹⁻¹¹⁾．

本研究では PLA_2 ，特に分子量が 14 kDa で細胞外に分泌される 2 つの分子種（I 型と II 型）について，基質加水分解の触媒機構や低分子阻害物質による阻害機構の共通点と相違点を明らかにするため，また，哺乳類由来酵素との一次構造上の類似点が指摘されている，

バクテリア由来 SMase について、触媒作用に関与するアミノ酸残基とそのイオン化状態を明らかにするために、酵素反応速度論に基づく実験を行った。

第一章

ホスホリパーゼ A₂ の触媒機構の解明

第一節 ウシ腓臓由来ホスホリパーゼ A₂ の触媒機構
-I 型と II 型 PLA₂ の触媒機構の共通点と相違点-

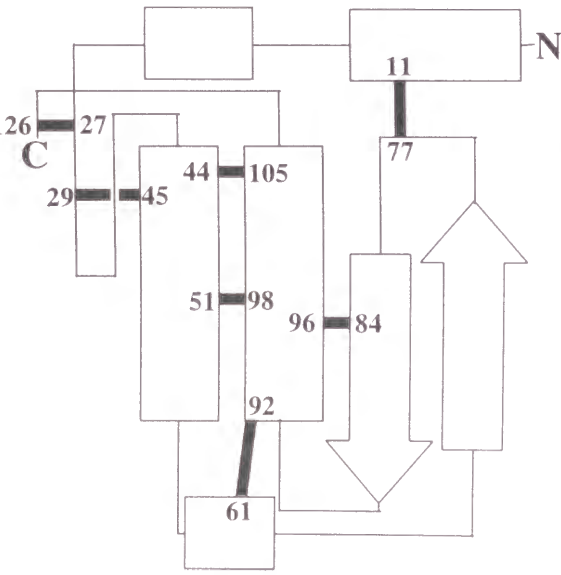
第一項 序

ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) [EC 3.1.1.4] はリン脂質の 2 位の脂肪酸エステル結合を加水分解する酵素である。本酵素は生物界に広く分布しており、最近の 5 年間ほどの研究で数多くの分子種が発見された (Table 1-1-1) ^{4, 13)}。その中で I 型と II 型 PLA₂ は、細胞外に分

Table 1-1-1 Classification of phospholipase A₂ [Refs. 4 and 13].

Group	Sources	Location	Size (kDa)	Ca ²⁺ requirement	Disulfides
I A	Cobras, kraits	Secreted	13-15	mM	7
	Bovine/human pancreas	Secreted	13-15	mM	7
II A	Rattlesnakes, vipers, human synovial fluid/platelets	Secreted	13-15	mM	7
B	Gaboon viper	Secreted	13-15	mM	6
C	Rat/mouse testes	Secreted	15	mM	8
III	Bees, lizards	Secreted	16-18	mM	5
IV	Raw 264.7, rat kidney, human U937/platelets	Cytosolic	85	<μM	
V	Human/rat/mouse heart/lung, P388D ₁ macrophages	Secreted	14	mM	6
VI	P388D ₁ macrophages, CHO cells	Cytosolic	80-85	None	
VII	Human plasma	Secreted	45	None	
VIII	Bovine brain	Cytosolic	29	None	
IX	Marine snail	Secreted	14	<mM	6

A: Group I



B: Group II

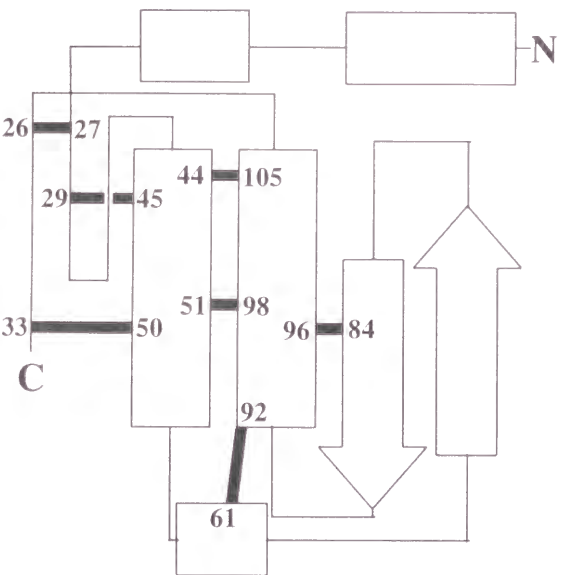


Fig. 1-1-1 Schematic representations of group I and II phospholipase A₂s based on the known three-dimensional structures. The diagrams are arranged to highlight the marked structural homology and are not necessarily to scale. The α helices are indicated by rectangles, β strands by arrows, and disulfide bridges by black bars. The amino and carboxyl termini are labeled N and C, respectively.

泌される分子量 14 kDa のモノマータンパク質で、酵素活性に Ca²⁺ が必須である。また、他の分子種に比べて古くから研究されてきたことから、その高次構造を含むタンパク質化学的な性質がかなり明らかにされている。I 型と II 型 PLA₂ の違いは (Fig. 1-1-1), II 型 PLA₂ のポリペプチド鎖が I 型 PLA₂ に比べ C 末端で 7 残基ほど長いことと、I 型 PLA₂ のジスルフィド結合が Cys 11 と Cys 77 の間に形成されているのに対し、II 型 PLA₂ では Cys 50 と C 末端の Cys 133 の間に形成されていることである ¹⁴⁾。これまでに、十数種類の I 型と II 型 PLA₂ の X 線結晶解析が行われたが、両酵素の触媒部位を含む高次構造に明確な違いは示されていない ¹⁵⁾。

I 型と II 型 PLA₂ の触媒機構にはセリンプロテアーゼに似た電荷リレー系が提案されている (Fig. 1-1-2)。その仮説によれば、触媒基 His 48 が水分子を介して基質の 2 位のカルボニル基の炭素原子を求核的に攻撃する。遷移状態においては、基質の切断されるべき 2 位のカルボニル酸素とリン酸基の酸素原子が PLA₂ と結合した Ca²⁺ と配位することにより、反応中間体が安定化されると考えられている。

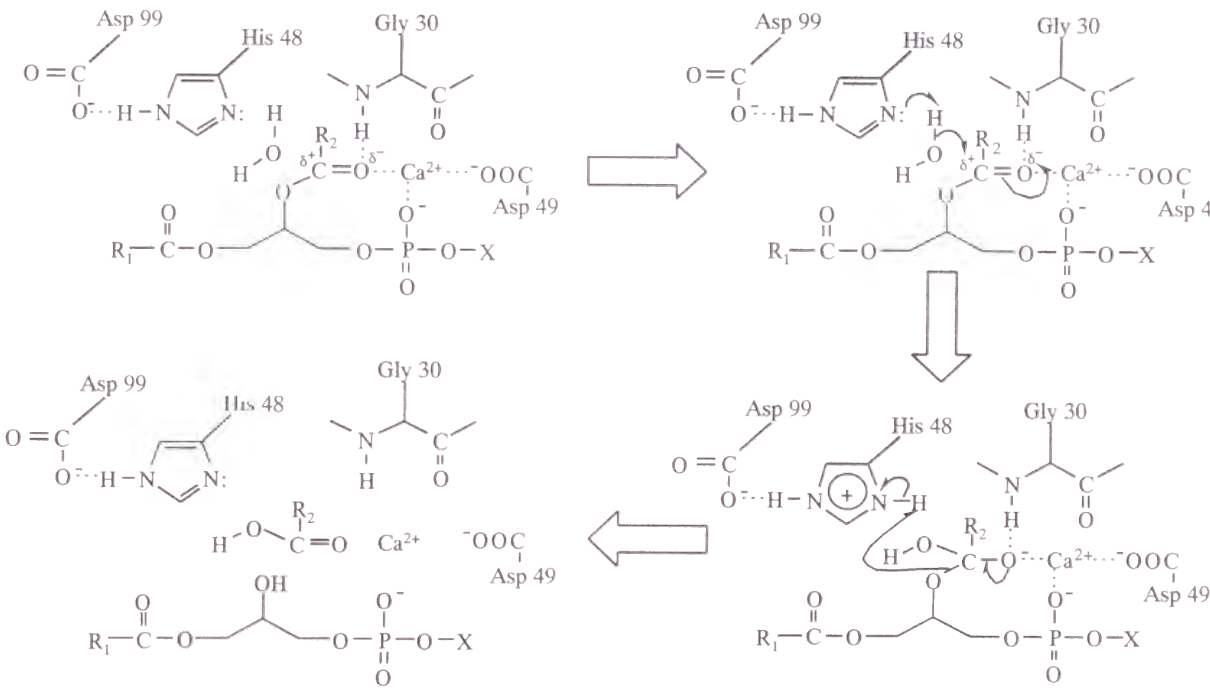


Fig. 1-1-2 Schematic representation of the catalytic mechanism for PLA₂.

これまでに我々の研究グループは、I 型に属するコブラ (*Naja naja atra*) 毒および II 型に属するマムシ (*Agkistrodon halys blomhoffii*) 毒とハブ (*Trimeresurus flavoviridis*) 毒由来 PLA₂ について、必須金属である Ca²⁺ との結合定数の pH 依存性 ¹⁶⁻²⁰⁾、PLA₂ の触媒基である His 48 を選択的に修飾する *p*-bromophenacyl bromide (BPB) との反応速度定数の pH 依存性 ¹⁹⁻²¹⁾、および単分子分散状 ²²⁻²⁵⁾ または混合ミセル状レシチン ²⁴⁻²⁷⁾ を基質とする酵素反応パラメーターにおよぼす Ca²⁺ の影響と pH 依存性を調べてきた。その結果、I 型と II 型 PLA₂ との間には、Ca²⁺ との結合力、BPB との反応性、および触媒作用における N 末端 α アミノ基の関与の仕方、基質結合におよぼす Ca²⁺ の影響に関して相違点が示された。しかし、I 型 PLA₂ については 1 種類の酵素でしか実験されていないので、これらの結果がす

すべての I 型と II 型 PLA₂ に適応できるかどうかはわからない。

PLA₂ は哺乳動物の各種臓器に存在することが知られている。特に膵臓には I 型に属する PLA₂ が豊富に存在する。膵臓由来 PLA₂ は前駆体 (pro-PLA₂) として消化管に分泌され、トリプシンにより N 末端領域で限定加水分解を受けて活性型 (active-PLA₂) に変換される²⁸⁾。ヘビ毒由来 PLA₂ にはこのような前駆体は存在しないことから、最近では、I 型 PLA₂ のうち典型的なヘビ毒由来 PLA₂ を IA 型、膵臓由来 PLA₂ を IB 型とする細分化がなされている¹³⁾ (Table 1-1-1)。

本研究では、これまで明らかにされてきた I 型と II 型 PLA₂ の酵素作用に関する違いが、すべての酵素にあてはまることを示すため、I 型 PLA₂ に属するウシ膵臓由来 PLA₂ について酵素反応速度論に基づく実験を行った。

第二項 pH 変化に対する酵素の安定性

ウシ膵臓由来 PLA₂ に関して異なる pH で種々の実験を行うために、まず本酵素の安定性におよぼす pH の影響を調べた。Fig. 1-1-3 は pro- および active-PLA₂ の遠紫外部 CD スペクトルを示す。両酵素はともに α ヘリックスに特有な 222 nm における負の楕円率の極大を示すことがわかった。次に、両酵素の 222 nm における負の楕円率を種々の pH で測定した (Fig. 1-1-3)。その結果、pH 11 以上の領域で負の楕円率の減少が見られ、その変化が時間依存的でかつ不可逆的であったことから、これらの酵素は pH 11 以上の領域で変性することがわかった。したがって、後の実験は pH 4.7 から 10.5 の範囲内で行うことにした。

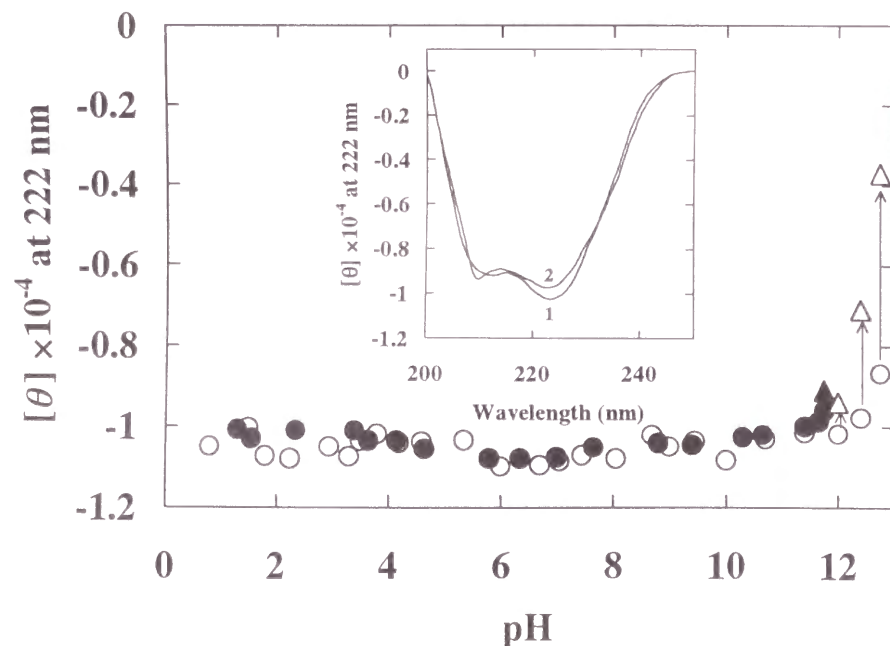


Fig.1-1-3 pH dependence of the negative ellipticities at 222 nm of bovine pancreatic pro- (○) and active PLA₂s (●). The triangles indicate the data after 30 min. The inset shows the CD spectra at pH 7.6 of the pro- (1) and active PLA₂s (2).

第三項 BPB による触媒基 His 48 の化学修飾

p-bromophenacyl bromide (BPB) は PLA₂ の触媒基である His 48 を選択的に化学修飾することが知られている^{19-21, 29-31)}。そこで、ウシ膵臓由来の active- および pro-PLA₂ に対する BPB の反応速度定数の pH 依存性を調べることににより、BPB との反応に関与するアミノ酸残基のイオン化状態を明らかにした。

1. PLA₂ と BPB との反応

BPB と PLA₂ との反応は反応中間複合体 (noncovalent intermediate complex) を介して起こると考えられている^{19-21, 29, 32)}。E, R, ER, および E* をそれぞれ、遊離の未修飾 PLA₂, 遊離の BPB, 反応中間複合体, および His 48 が修飾された PLA₂ とすると、BPB と PLA₂ との反応様式は次式で表される。



ここで、 K^{ER} と κ はそれぞれ、反応中間複合体の解離定数と修飾酵素生成の速度定数を示す。

BPB のモル濃度 (C_R) が酵素の全モル濃度 (C_E^0) よりも著しく高い実験条件では、式 (1-1-1) の反応は擬一次速度式に従うので、次式が得られる。

$$\log \frac{C_E^0 - C_E^*}{C_E^0} = -0.436 \kappa_{obs} t \quad (1-1-2)$$

ここで、 C_E^* と κ_{obs} はそれぞれ、修飾された酵素のモル濃度と反応の擬一次速度定数である。 κ_{obs} は次式で表される。

$$\kappa_{obs} = \frac{\kappa C_R}{K^{ER} + C_R} \quad (1-1-3)$$

Fig. 1-1-4A は、種々の BPB 濃度における active-PLA₂ の残存酵素活性 (v/v_0) の対数を反応時間 (t) に対してプロットした結果を示す。ここで、 v と v_0 はそれぞれ反応時間が t と 0 のときの酵素活性を示し、 v/v_0 は式 (1-1-2) 中の $(C_E^0 - C_E^*)/C_E^0$ に相当する。Fig. 1-1-4B は、Fig. 1-1-4A の結果から求めた見かけの速度定数 (κ_{obs}) を BPB のモル濃度 (C_R) に対してプロットした結果を示す。式 (1-1-3) に対応するこのプロットがほぼ原点を通る直線になったことから、式 (1-1-3) は $\kappa_{obs} = (\kappa/K^{ER}) C_R$ と表すことができ、これは K^{ER} 値が実験に用いた BPB 濃度 (C_R) よりも著しく大きいことを示す。すなわち、式 (1-1-1) において、ER 複合体の存在は無視できることがわかった。同様の結果は pro-PLA₂ についても得られた。

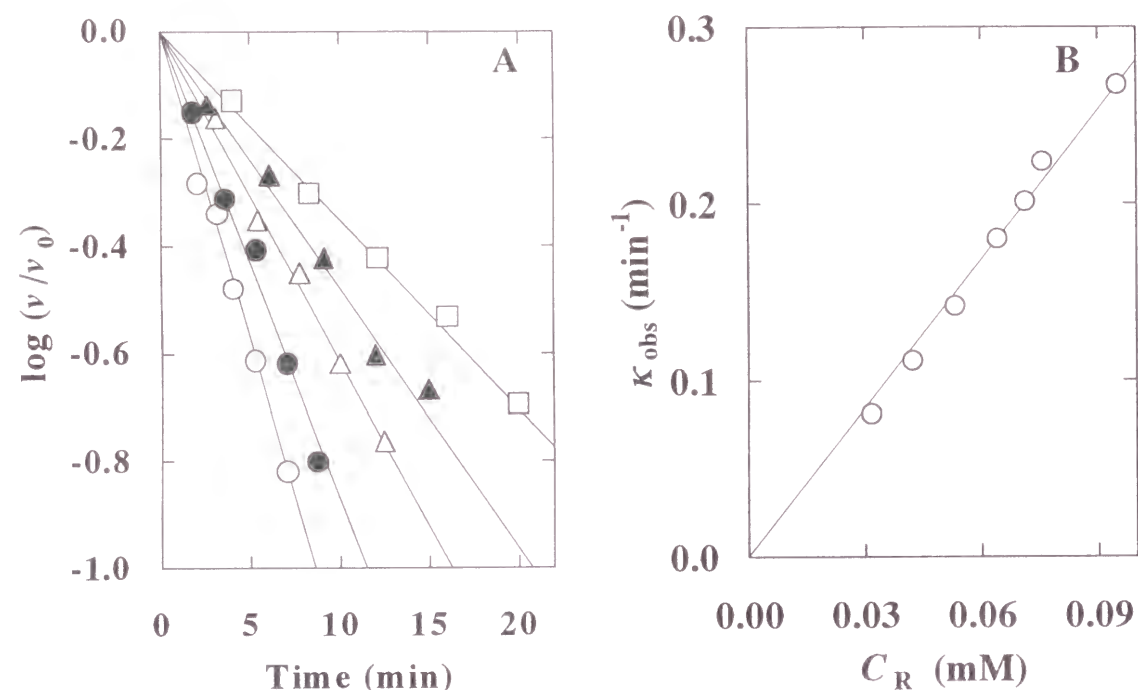


Fig. 1-1-4 Effect of BPB concentration on the kinetics of the BPB reaction with bovine pancreatic active-PLA₂. A: ○, 0.095 mM; ●, 0.071 mM; △, 0.053 mM; ▲, 0.042 mM; and □, 0.032 mM BPB. B: Observed rate constants (k_{obs}) plotted as a function of BPB concentrations (C_R) according to Eq. 1-1-3.

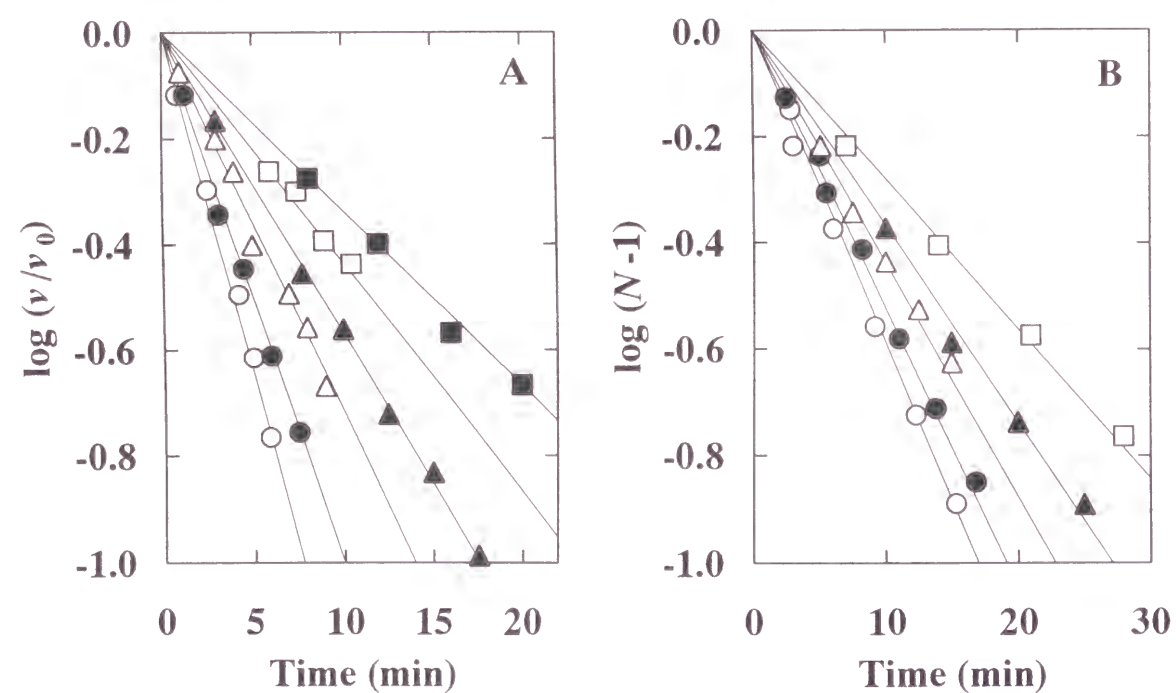


Fig. 1-1-5 Effect of pH on the kinetics of the BPB reaction with bovine pancreatic active- and pro-PLA₂s. A, active-PLA₂: ○, pH 7.72; ●, pH 6.94; △, pH 9.30; ▲, pH 6.51; □, pH 9.58; ■, pH 6.09. B, pro-PLA₂: ○, pH 8.90; ●, pH 7.23; △, pH 9.38; ▲, pH 6.73; □, pH 6.42.

2. PLA₂ と BPB との反応速度定数の pH 依存性

Fig. 1-1-5 は、種々の pH における active- および pro-PLA₂ と BPB との反応データの式 (1-1-2) に従ったプロットを示す. pro-PLA₂ の場合、式 (1-1-2) 中の $(C_E^0 - C_E^*)/C_E^0$ は未修飾 His 48 の相対残基数 ($N-1$) で置きかえることができる. ここで、 N はアミノ酸組成分析により求めた pro-PLA₂ の残存 His の相対残基数を示す (本酵素は分子内に His を 2 分子しか含まず³³⁾, BPB はそのうちの His 48 のみを特異的に修飾する).

Fig. 1-1-5 に示した直線の傾きから、見かけの二次速度定数 k_{obs}/C_R を求め、それらを pH に対してプロットした (Fig. 1-1-6). どちらの酵素の pH 依存性曲線にも 2 つの転移が見られたことから、BPB と PLA₂ との反応には 2 つのアミノ酸残基のイオン化が関与することがわかった.

PLA₂ と BPB との反応に 2 つのアミノ酸残基のイオン化が関与する場合、未修飾酵素とその BPB 複合体に関して 8 つのミクロ分子種の存在を考える必要がある: EH₂(1,1), EH(1,0), EH(0,1), E(0,0), EH₂R(1,1), EHR(1,0), EHR(0,1), ER(0,0). ここで、括弧内の数字はそれぞれ 2 つの解離基のイオン化状態を表し、1 と 0 はそれぞれがプロトン化状態と脱プロトン化状態にあることを示す. His 48 がプロトン化していると BPB と反応できないので、pH 7 以下の領域で見られる転移は His 48 のプロトン化に伴うものと考えられる. したがって、8 つのミクロ分子種のうち、EHR(0,1) と ER(0,0) のみが修飾酵素を生成すると仮定し、それぞれの速度定数を k_1 と k_2 とすると、次の反応スキームが想定できる.

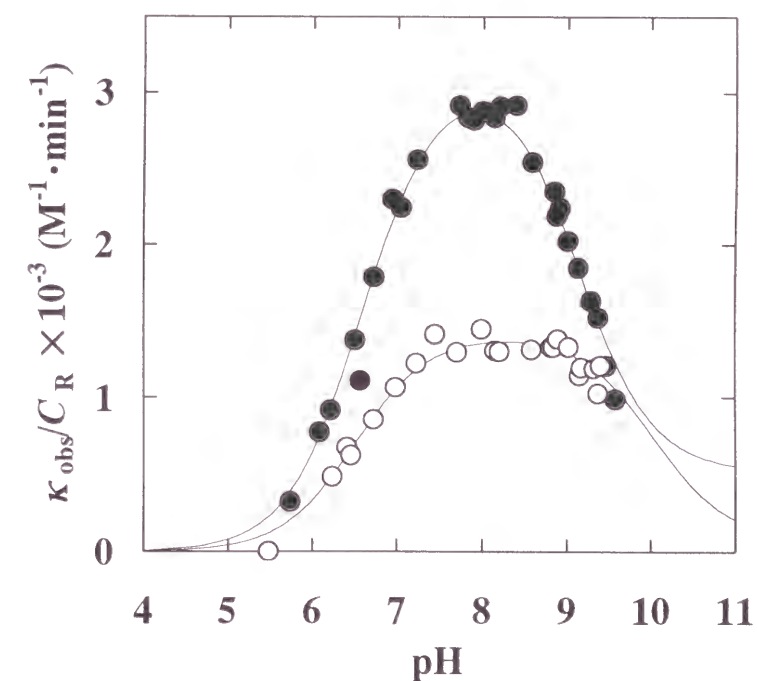
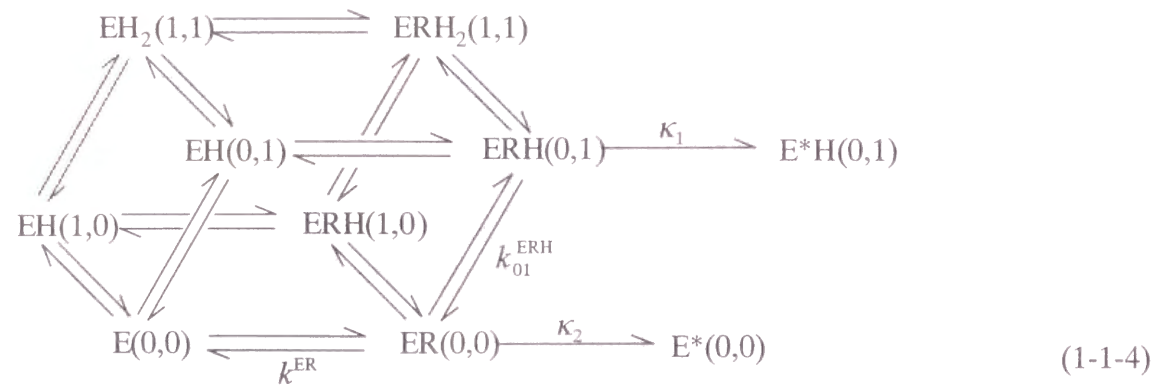


Fig. 1-1-6 pH dependence of the apparent second-order rate constants, k_{obs}/C_R , of BPB reaction with bovine pancreatic active- (●) and pro- (○) PLA₂s. The solid curves are the theoretical ones constructed according to Eq. 1-1-5 by using the parameters given in the text.



BPB のモル濃度が酵素のモル濃度よりも非常に高い場合、ある一定 pH における見かけの二次速度定数 k_{obs}/C_R は、式 (1-1-4) に従って次式で表わすことができる。

$$\frac{k_{\text{obs}}}{C_R} = \frac{A \cdot [\text{H}^+] + B}{\frac{[\text{H}^+]^2}{K^{\text{EH}_2} \cdot K^{\text{EH}}} + \frac{[\text{H}^+]}{K^{\text{EH}}} + 1} \cdot C \quad (1-1-5)$$

ここで、 K^{EH_2} と K^{EH} はそれぞれ、酸性およびアルカリ性 pH 領域における 2 つの解離基からの H^+ のマクロ解離定数を示す。また、A, B, および C は次式で表される定数である。

$$A = \frac{K_1}{k_{01}^{\text{ERH}} \cdot k^{\text{ER}}} \quad (1-1-6)$$

$$B = \frac{K_2}{k^{\text{ER}}} \quad (1-1-7)$$

$$C = \frac{K^{\text{ER}}}{K^{\text{ER}} + C_R} \quad (1-1-8)$$

ここで、 k_{01}^{ERH} と k^{ER} はそれぞれ、分子種 $\text{ERH}(0,1)$ からの H^+ のミクロ解離定数と分子種 $\text{ER}(0,0)$ からの BPB のミクロ解離定数を表す。 K^{ER} は反応中間複合体からの BPB のマクロ解離定数を示す。ここで、Fig. 1-1-4 の結果から K^{ER} は C_R より著しく大きいことがわかっているので、式 (1-1-8) 中の C は実際上 1 となる。Fig. 1-1-6 中の実線は、式 (1-1-5) にそれぞれのパラメーターとして、active-PLA₂ については $\text{p}K^{\text{EH}_2} = 6.6$, $\text{p}K^{\text{EH}} = 9.15$, $A = 4.45 \times 10^{12} \text{ M}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$, および $B = 5.32 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, pro-PLA₂ については $\text{p}K^{\text{EH}_2} = 6.52$, $\text{p}K^{\text{EH}} = 10.03$, $A = 1.51 \times 10^{13} \text{ M}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$, および $B = 8.16 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ を代入して得られた理論曲線であり、実験値とよく一致した。

Fig. 1-1-6 に示したように、active- および pro-PLA₂ と BPB との反応速度定数の pH 依存性曲線は二相性である。酸性 pH 領域における転移は His 48 によるものと考えられる。以前、コブラ (*N. naja atra*) 毒由来 PLA₂ について得られた二相性曲線において、N 末端の α アミノ基を α ケト基に置換するとアルカリ性 pH 領域の転移が消失した^{19, 21)}。したがって、ウシ膵臓由来 active-PLA₂ のアルカリ性 pH 領域の転移は α アミノ基によるものと推定した。

pro-PLA₂ においては、active-PLA₂ の N 末端にヘプタペプチドが結合しており、その N 末端のアミノ酸である Glu は pyroglutamate になっているので α アミノ基は存在しない³⁴⁾。しかし、pro-PLA₂ のヘプタペプチドには唯一の塩基性アミノ酸 Arg -1 (アミノ酸残基のナンバリングは active-PLA₂ の N 末端から開始する) が含まれているので、アルカリ性 pH 領域に見られる pro-PLA₂ の転移は Arg -1 によるものと考えられる。得られた $\text{p}K$ 値 10.3 は一般的な Arg 残基の値 (12.5) に比べ幾分低いですが、本酵素の Arg -1 の C 末端は他の Arg 残基に比べてトリプシンにより優先的に切断されることから考えると^{28, 34)}、この低い $\text{p}K$ 値はタンパク質分子内の特別な環境下に Arg -1 が存在するためと考えられた。

第四項 Ca²⁺ の結合様式

PLA₂ の活性発現には Ca²⁺ が必須である。X 線結晶解析の結果によると (Fig. 1-1-7), 結合 Ca²⁺ は、Tyr 28, Gly 30, および Gly 32 の主鎖のカルボニル酸素、負に荷電した Asp 49 の側鎖、および 2 分子の H₂O の酸素原子と配位しており、基質が酵素に結合すると、基質の 2 位のカルボニル酸素とリン酸基の酸素原子がこれらの H₂O 分子と置換すると考えられている¹⁵⁾。そこで、PLA₂ に対する Ca²⁺ の結合定数の pH 依存性を調べることににより、Ca²⁺ 結合に関与するアミノ酸残基のイオン化状態を明らかにすることを試みた。

Fig. 1-1-8A と Fig. 1-1-9A はそれぞれ、active- と pro-PLA₂ の Ca²⁺ 存在下と非存在下における蛍光スペクトルの比較を示す。

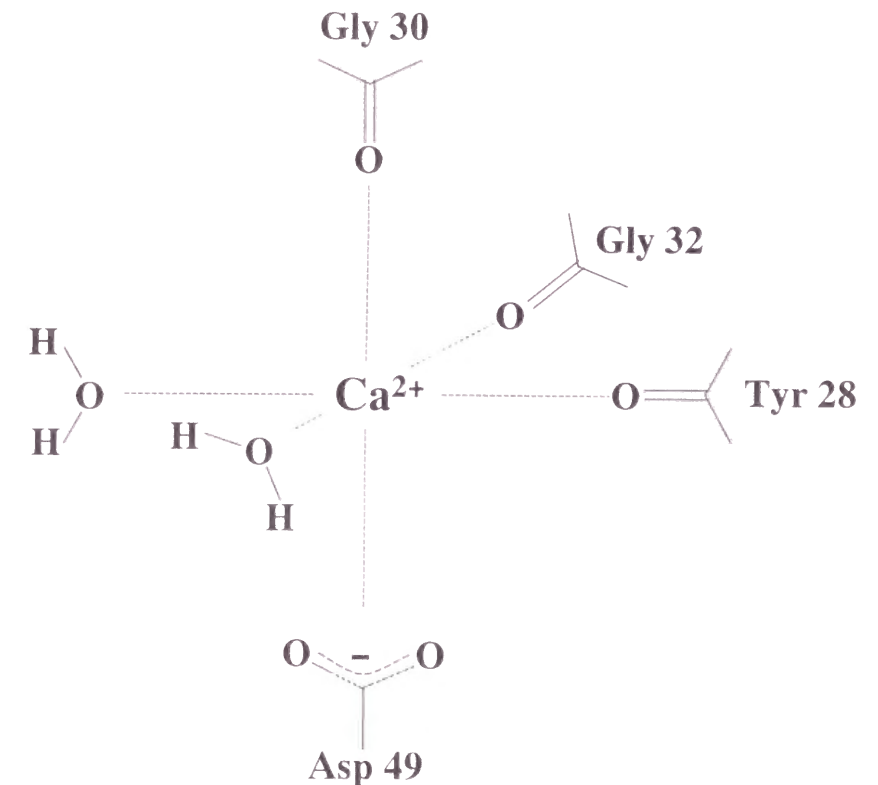


Fig. 1-1-7 Schematic representation of the mode of interaction of Ca²⁺ with its ligands in the bovine pancreatic phospholipase A₂ molecule.

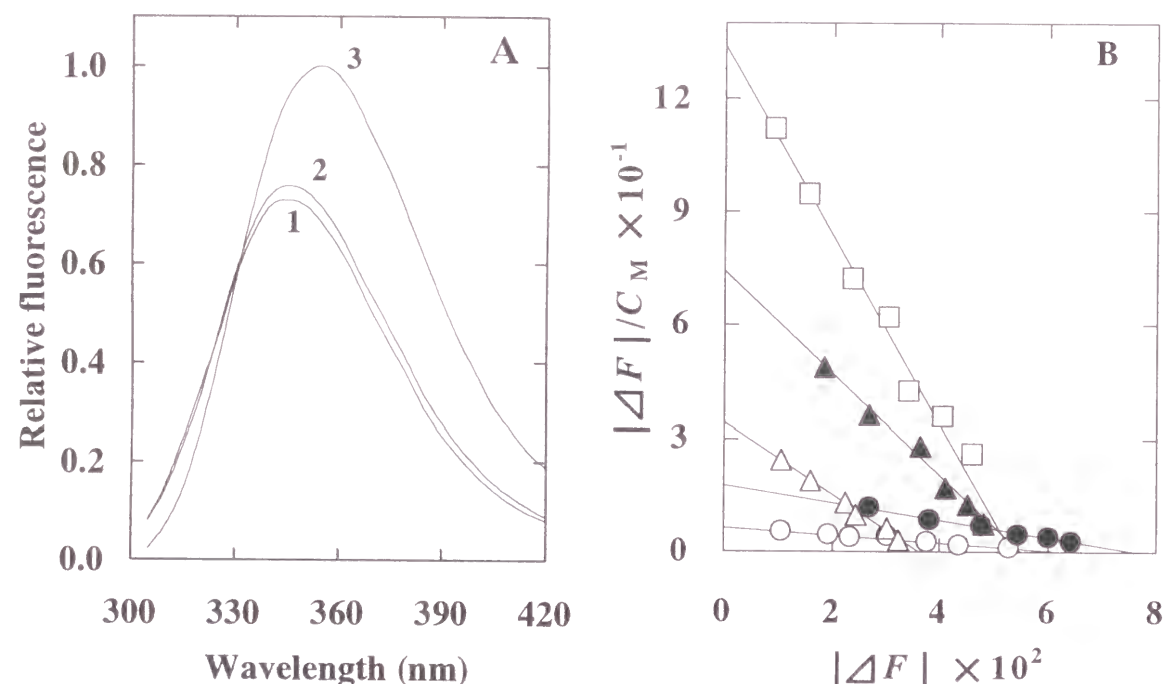


Fig. 1-1-8 Determination of the binding constants of Ca^{2+} by the fluorescence spectra change of bovine pancreatic active- PLA_2 . A: Fluorescence spectra of bovine pancreatic active- PLA_2 excited at 290 nm. 1, apoenzyme; 2, Ca^{2+} -complex; 3, N-acetyl-L-tryptophanamide at the same molar concentration as the enzyme. B: Determination of the binding constants of Ca^{2+} according to Eq. 1-1-9. ○, pH 5.64; ●, pH 6.05; △, pH 7.66; ▲, pH 8.38; □, pH 9.04.

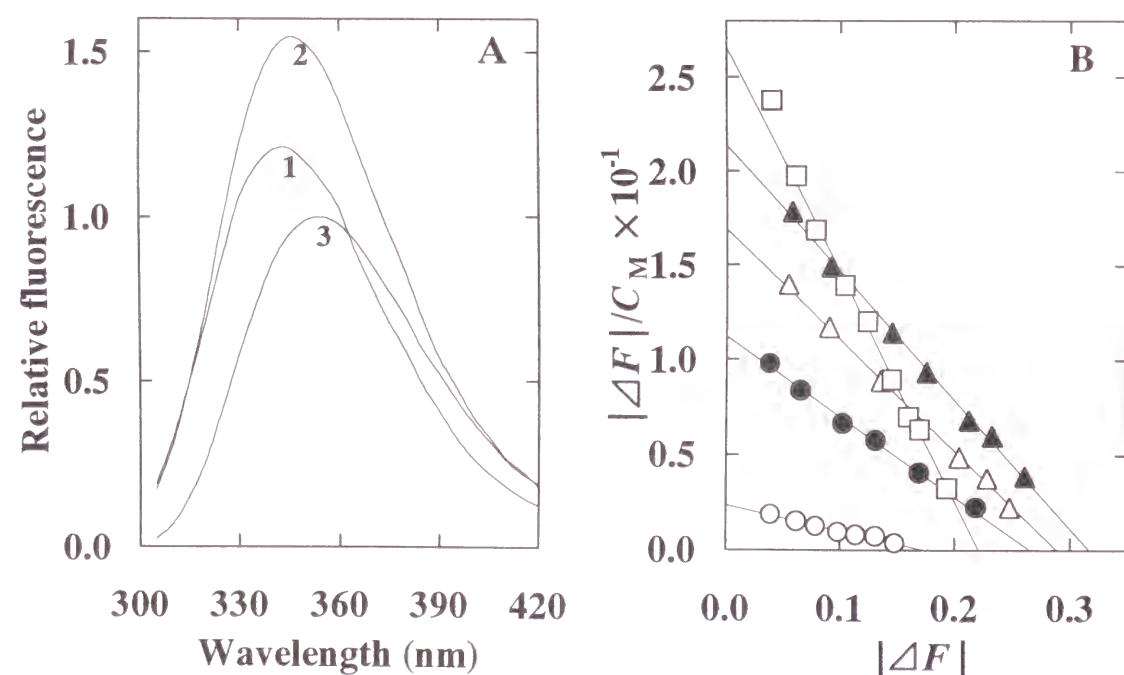


Fig. 1-1-9 Determination of the binding constants of Ca^{2+} by the fluorescence spectra change of bovine pancreatic pro- PLA_2 . A: Fluorescence spectra of bovine pancreatic pro- PLA_2 excited at 290 nm. 1, apoenzyme; 2, Ca^{2+} -complex; 3, N-acetyl-L-tryptophanamide at the same molar concentration as the enzyme. B: Determination of the binding constant of Ca^{2+} according to Eq. 1-1-9. ○, pH 5.72; ●, pH 6.57; △, pH 7.36; ▲, pH 8.08; □, pH 9.29.

どちらの PLA_2 の最大蛍光波長も 348 nm であったが、その強度は pro- PLA_2 の方が大きかった。また、 Ca^{2+} の添加により、どちらの PLA_2 の蛍光強度も増大した。そこで、 Ca^{2+} の添加による 348 nm の蛍光強度の増加 ($|\Delta F|$) を測定することにより、 Ca^{2+} の結合定数 ($1/K^{\text{EM}}$) を求めた。Fig. 1-1-8B と Fig. 1-1-9B は、種々の pH における蛍光強度の変化と Ca^{2+} 濃度の関係を次式に従ってプロットした結果を示す。

$$|\Delta F|/C_M = \frac{1}{K^{\text{EM}}} (|\Delta F| - |\Delta F_{\text{EM}}|), \quad (1-1-9)$$

ここで、 $|\Delta F_{\text{EM}}|$ は PLA_2 に Ca^{2+} が飽和量結合したときの $|\Delta F|$ の極限値を、 C_M は遊離 Ca^{2+} の平衡モル濃度を示す。ただし、添加した Ca^{2+} 濃度は酵素の全モル濃度よりも十分に高いので、 C_M には添加した Ca^{2+} の全モル濃度を用いた。式 (1-1-9) に従って直線の傾きから Ca^{2+} の結合定数を求め、それらを pH に対してプロットした (Fig. 1-1-10)。

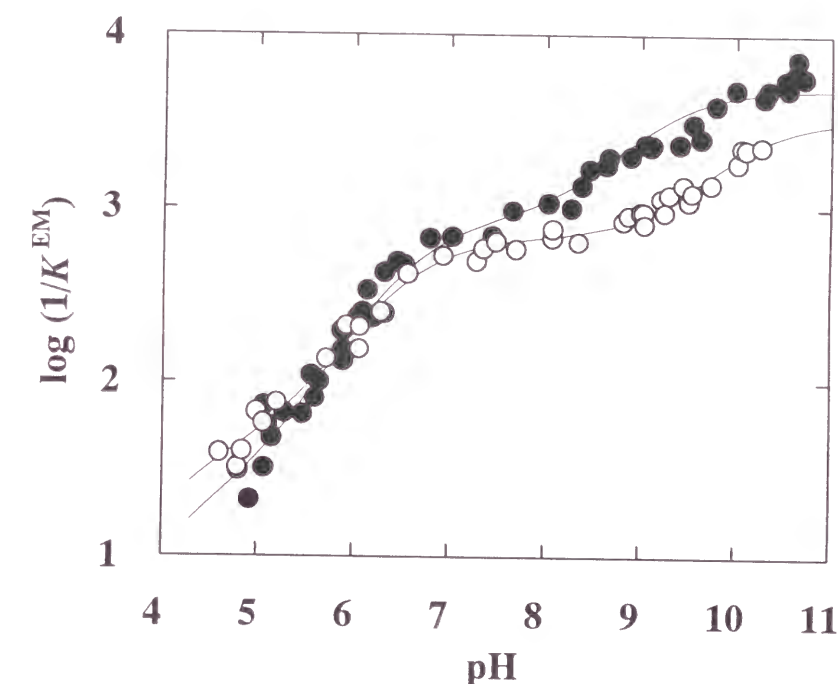
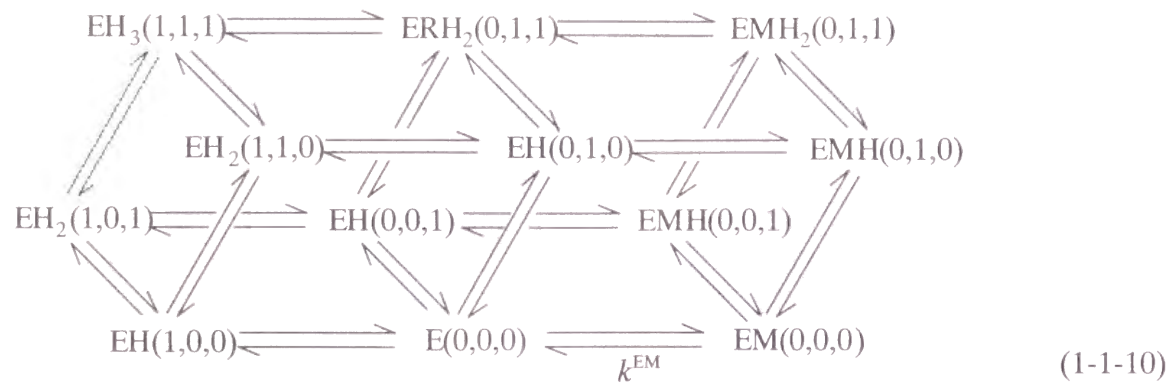


Fig. 1-1-10 pH dependence of the logarithm of the binding constants of Ca^{2+} to the active- (●) and pro- (○) PLA_2 s. The solid curves are the theoretical ones constructed according to Eq. 1-1-11 by using the parameters given in the text.

以前我々の研究グループは、数種類のヘビ毒由来 PLA_2 について同様の実験を行い、 Ca^{2+} の結合には Asp 49, His 48, および N 末端 α アミノ基が関与し、Asp 49 がプロトン化すると Ca^{2+} は結合できなくなることを示した¹⁶⁻²⁰⁾。したがって、ウシ膵臓由来 active- PLA_2 についても同様に考え、データを次のスキームを基に解析した。



ここで、E, H, および M はそれぞれ、酵素, H^+ , および Ca^{2+} を示し、括弧内の数字は左から Asp 49, His 48, および N 末端 α アミノ基のイオン化状態を表す。1 と 0 はそれぞれがプロトン化状態および脱プロトン化状態にあることを示し、 k^{EM} は 3 つの解離基が完全に脱プロトン化した分子種 EM(0,0,0) からの Ca^{2+} のミクロ解離定数を示す。

式 (1-1-10) に基づけば、 Ca^{2+} の結合定数と H^+ 濃度との関係は次式で表される。

$$\log(1/K^{\text{EM}}) = \log \frac{\frac{[\text{H}^+]^2}{K^{\text{EMH}_2} \cdot K^{\text{EMH}}} + \frac{[\text{H}^+]}{K^{\text{EMH}}} + 1}{\frac{[\text{H}^+]^3}{K^{\text{EH}_3} \cdot K^{\text{EH}_2} \cdot K^{\text{EH}}} + \frac{[\text{H}^+]^2}{K^{\text{EH}_2} \cdot K^{\text{EH}}} + \frac{[\text{H}^+]}{K^{\text{EH}}} + 1} + \log(1/k^{\text{EM}}) \quad (1-1-11)$$

ここで、 K^{EH_3} , K^{EH_2} , および K^{EH} はアポ酵素からの H^+ のマクロ解離定数であり、 K^{EMH_2} と K^{EMH} は、酵素- Ca^{2+} 複合体からの H^+ のマクロ解離定数である。

Fig. 1-1-6 に示した BPB との反応速度定数の pH 依存性曲線から、ウシ膵臓由来アポ PLA₂ の His 48 と α アミノ基の pK 値はすでに、それぞれ $\text{pK}^{\text{EH}_2} = 6.6$ と $\text{pK}^{\text{EH}} = 9.15$ と決定した。他方、第七項で示すように、単分子分散状基質を用いたときの触媒中心活性 k_{cat} の pH 依存性曲線の解析から、酵素- Ca^{2+} 複合体の His 48 と α アミノ基の pK 値はそれぞれ $\text{pK}^{\text{EMH}_2} = 5.0$ と $\text{pK}^{\text{EMH}} = 8.4$ である。これらのパラメータを式 (1-1-11) に代入し、Fig. 1-1-10 のデータを解析した結果、 pK^{EH_3} と $1/k^{\text{EM}}$ にそれぞれ 4.1 と $4.89 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ を代入して得られた理論曲線は実験値とよく一致することがわかった。

pro-PLA₂ の場合、N 末端アミノ酸は pyroglutamate なので、N 末端 α アミノ基は存在しない。しかし、Fig. 1-1-10 の結果は、2 つのアミノ酸残基 (Asp 49 と His 48) の関与だけでは説明できなかった。Fig. 1-1-6 に示した pro-PLA₂ と BPB との反応の場合には、active-PLA₂ の場合に関与すると考えられた α アミノ基の代わりに Arg -1 の関与を仮定した。そこで、pro-PLA₂ と Ca^{2+} との結合の場合にも、Asp 49, His 48, および Arg -1 の 3 つのアミノ酸残基が関与すると考えた。

Fig. 1-1-6 で得られた His 48 と Arg -1 の pK 値 ($\text{pK}^{\text{EH}_2} = 6.52$ と $\text{pK}^{\text{EH}} = 10.03$) を式 (1-1-11) に代入してデータを解析した結果、 pK^{EH_2} , pK^{EMH_2} , pK^{EMH} , および $1/k^{\text{EM}}$ にそれぞれ 4.15, 5.31, 9.34, および $3.29 \times 10^3 \text{ M}$ を代入して得られた理論曲線は実験値とよく一致することがわかった。

第五項 短鎖レシチンの加水分解反応

PLA₂ の酵素活性は、基質であるリン脂質がミセルを形成すると急激に増大することが知られている。これは、PLA₂ 分子内の触媒部位とは別の場所に界面認識部位が存在することで説明されている³⁵⁾。本実験では、短鎖レシチン dihexanoly-*sn*-glycerophosphocholine (diC₆PC) を基質とし、その臨界ミセル濃度 (cmc) 前後でウシ膵臓由来 PLA₂ の酵素活性を詳しく測定した。

Fig. 1-1-11A は、active- および pro-PLA₂ による diC₆PC の加水分解反応における初速度 (v) の基質濃度依存性を示す。

active-PLA₂ による加水分解速度は、基質濃度が臨界ミセル濃度 ($\text{cmc} = 13.6 \text{ mM}^{16, 36)}$) を超えると急激に増大した。同様の結果は *N. naja atra*, *A. halys blomhoffii*, *T. flavoviridis* などの種々のヘビ毒やブタ膵臓由来 PLA₂ についても報告されている^{22-24, 37)}。他方, pro-PLA₂ は active-PLA₂ に比べて活性が低く, cmc 前後の基質濃度においても酵素活性の著しい違いは見られなかった。

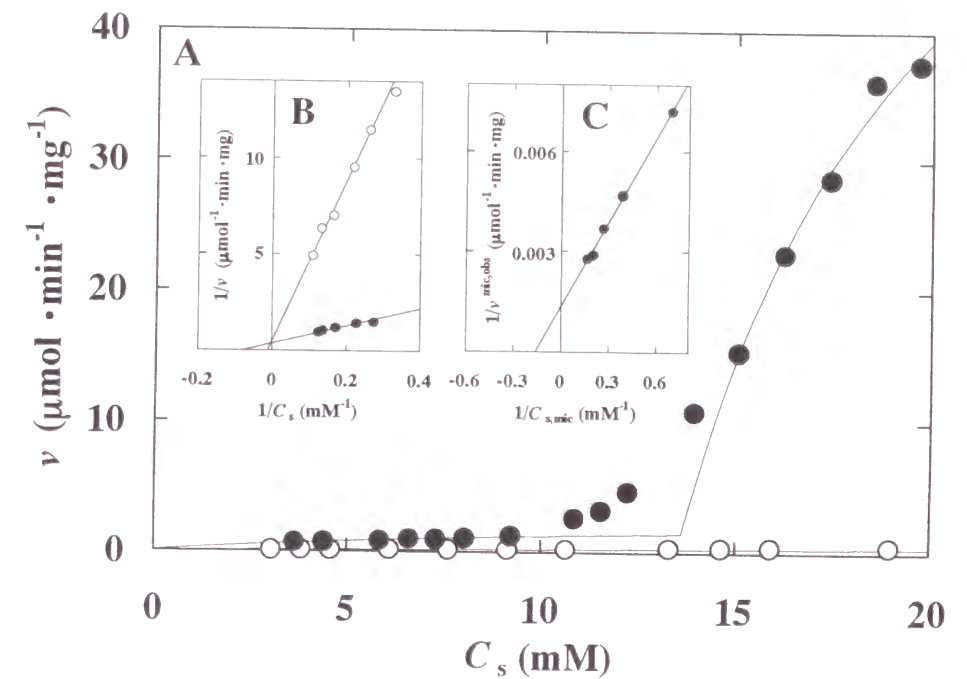


Fig. 1-1-11 The hydrolysis of diC₆PC catalyzed by bovine pancreatic PLA₂. A: Initial velocities of the hydrolysis of diC₆PC catalyzed by bovine pancreatic pro- (○) and active-PLA₂s (●) plotted as a function of the molar concentration of the substrate. B: The Lineweaver-Burk plots of the kinetic data obtained at the substrate concentrations below the cmc. C: The Lineweaver-Burk plot of the kinetic data for the active PLA₂ obtained at the substrate concentrations above the cmc. The solid lines and curves were drawn according to Eqs. 1-1-12, 1-1-13, and 1-1-14 by using the parameters given in the text.

cmc 以下の基質濃度範囲における酵素反応は次の Michaelis-Menten 式に従う。

$$v = \frac{V_{\text{max}}^{\text{mon,app}} \cdot C_s}{K_m^{\text{mon,app}} + C_s} \quad (1-1-12)$$

ここで、 $K_m^{\text{mon,app}}$ と $V_{\text{max}}^{\text{mon,app}}$ はそれぞれ、基質が単分子分散状態のときの見かけのミカエリス定数と最大速度を示す。Fig. 1-1-11B はデータの Lineweaver-Burk プロットを示す。

式 (1-1-12) に従ってデータの非線形解析を行った結果、active-PLA₂ の $K_m^{\text{mon,app}}$ と $V_{\text{max}}^{\text{mon,app}}$ はそれぞれ 1.14×10^{-2} M と $2.63 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 、pro-PLA₂ のそれぞれの値は 4.55×10^{-2} M と $1.19 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ となった。また、active-PLA₂ と pro-PLA₂ の触媒中心活性 ($k_{\text{cat}}^{\text{mon,app}}$) はそれぞれの分子量 13,795 と 14,523 を用いて計算し、36.3 と 17.3 min^{-1} となった。

cmc 以上の基質濃度範囲における active-PLA₂ のデータは、単分子分散状態とミセル状態の2種類の基質が共存するとする Wells らの式³⁸⁾に基づいて解析した。

$$v = \frac{\frac{(\text{cmc})}{K_m^{\text{mon,app}}} \cdot V_{\text{max}}^{\text{mon,app}} + \frac{C_s - (\text{cmc})}{K_m^{\text{mic,app}}} \cdot V_{\text{max}}^{\text{mic,app}}}{1 + \frac{(\text{cmc})}{K_m^{\text{mon,app}}} + \frac{C_s - (\text{cmc})}{K_m^{\text{mic,app}}}} \quad (1-1-13)$$

ここで、 $K_m^{\text{mic,app}}$ と $V_{\text{max}}^{\text{mic,app}}$ はそれぞれ、ミセル状基質に対する見かけのミカエリス定数と最大速度を示し、(cmc) は cmc の値 (13.6 mM) を示す。式 (1-1-13) は次のように書き換えることができる。

$$v_{\text{mic,obs}} = \frac{V_{\text{max}}^{\text{mic,obs}} \cdot C_{\text{S,mic}}}{K_m^{\text{mic,obs}} + C_{\text{S,mic}}} \quad (1-1-14)$$

ここで、 $v_{\text{mic,obs}}$ は反応速度の実験値 v から基質濃度が cmc のときの反応速度 v_{cmc} を引いた値 ($v_{\text{mic,obs}} = v - v_{\text{cmc}}$) を示し、 $C_{\text{S,mic}}$ はミセル状態の基質のモル濃度 [$C_{\text{S,mic}} = C_s - (\text{cmc})$] を示す。 $K_m^{\text{mic,obs}}$ と $V_{\text{max}}^{\text{mic,obs}}$ はそれぞれ次式により表される。

$$K_m^{\text{mic,obs}} = \left[1 + \frac{(\text{cmc})}{K_m^{\text{mon,app}}} \right] \cdot K_m^{\text{mic,app}} \quad (1-1-15)$$

$$V_{\text{max}}^{\text{mic,obs}} = V_{\text{max}}^{\text{mic,app}} - v_{\text{cmc}} \quad (1-1-16)$$

Fig. 1-1-11C は、cmc 以上の基質濃度範囲における active-PLA₂ のデータを式 (1-1-14) に基づいて Lineweaver-Burk プロットした結果を示す。式 (1-1-14) に従ってデータの非線形解析を行い、 $K_m^{\text{mic,obs}}$ と $V_{\text{max}}^{\text{mic,obs}}$ の値はそれぞれ 6.29×10^{-3} M と $75.2 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ と決定した。また、Fig. 1-1-11B で求めた active-PLA₂ のパラメーター ($K_m^{\text{mon,app}} = 1.14 \times 10^{-2}$ M と $v_{\text{cmc}} = 1.43 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) を式 (1-1-15) と (1-1-16) に代入することにより、 $K_m^{\text{mic,app}}$ と $V_{\text{max}}^{\text{mic,app}}$ の値はそれぞれ、 2.86×10^{-3} M と $76.6 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ となり、触媒中心活性 $k_{\text{cat}}^{\text{mic,app}}$ は $1.06 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ となった。Fig. 1-1-11A の実線は上記のパラメーターを式 (1-1-12) と (1-1-13) に代入して得られた理論曲線を示す。

第六項 単分子分散状およびミセル状レシチンの加水分解反応におよぼす Ca²⁺ の影響

Ca²⁺ は PLA₂ の酵素活性に必須であるので、単分子分散状 diC₆PC およびミセル状 diC₇PC を基質とするウシ膵臓由来 PLA₂ の酵素反応のパラメーターを種々の Ca²⁺ 濃度で求めることにより、PLA₂ の触媒作用における Ca²⁺ の関与の仕方を調べた。

Fig. 1-1-12A は種々の濃度の Ca²⁺ 存在下、単分子分散状 diC₆PC を基質としたときの速度論データの Lineweaver-Burk プロットを示す。この実験から、Ca²⁺ 濃度の増加に伴って見かけの最大速度 ($V_{\text{max}}^{\text{app}}$) は増大するが、見かけのミカエリス定数 (K_m^{app}) は変化しないことがわかった。同様の結果は pH 5.5 と 9.0 でも得られた。

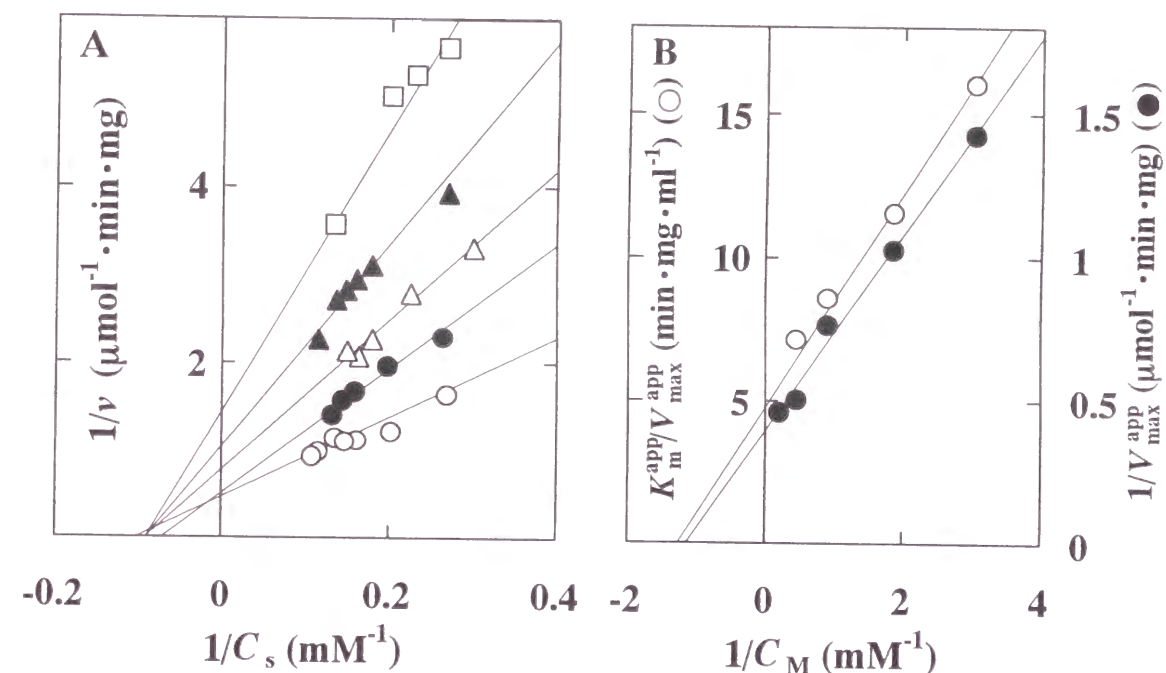
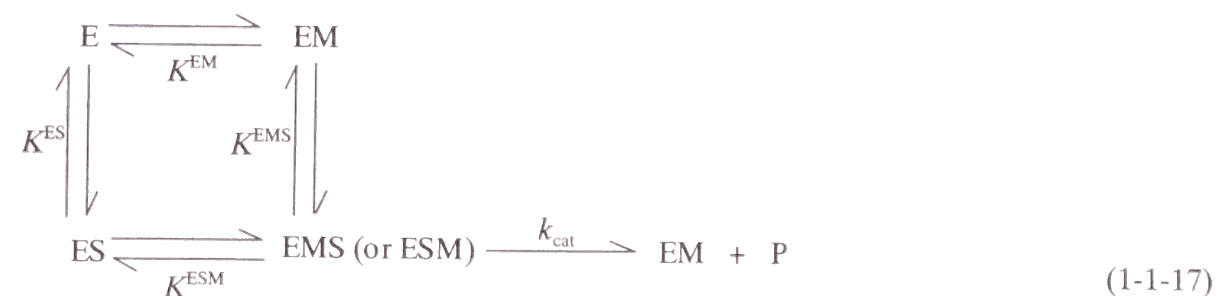


Fig. 1-1-12 Effect of Ca²⁺ on the kinetics of the hydrolysis of monodispersed diC₆PC, catalyzed by bovine pancreatic PLA₂ at pH 7.5. A; The Lineweaver-Burk plots of the kinetic data in the presence of 0.33 mM (□), 0.54 mM (▲), 1.09 mM (△), 2.20 mM (●), and 4.93 mM (○) Ca²⁺. B; The reciprocal of the apparent maximum velocity, $1/V_{\text{max}}^{\text{app}}$ (●), and the apparent parameter, $K_m^{\text{app}}/V_{\text{max}}^{\text{app}}$ (○), were each plotted as a function of the reciprocal of Ca²⁺ concentration, $1/C_M$, according to Eqs. 1-1-19 and 1-1-18, respectively.

ここで、E、M、S、および P をそれぞれ、酵素、Ca²⁺、基質、および生成物とし、 K^{EM} と K^{ESM} をそれぞれ、酵素-Ca²⁺ 複合体 (EM) と酵素-基質-Ca²⁺ 複合体 (ESM) からの Ca²⁺ (M) の解離定数とし、 K^{ES} と K^{EMS} をそれぞれ、酵素-基質複合体 (ES) と酵素-Ca²⁺-基質複合体 (EMS) からの基質 (S) の解離定数とすると、反応のスキームは次のように表される。



このスキームに従えば、ある一定 Ca^{2+} 濃度 (C_M) における見かけの酵素反応パラメーター, $K_m^{\text{app}}/V_{\text{max}}^{\text{app}}$ と $1/V_{\text{max}}^{\text{app}}$ は次式で表される。

$$\frac{K_m^{\text{app}}}{V_{\text{max}}^{\text{app}}} = \frac{K_m \cdot K^{\text{EM}}}{V_{\text{max}}} \cdot \frac{1}{C_M} + \frac{K_m}{V_{\text{max}}} \quad (1-1-18)$$

$$\frac{1}{V_{\text{max}}^{\text{app}}} = \frac{K^{\text{ESM}}}{V_{\text{max}}} \cdot \frac{1}{C_M} + \frac{1}{V_{\text{max}}} \quad (1-1-19)$$

ここで, K_m と V_{max} はそれぞれ, 酵素が Ca^{2+} で完全に飽和されているときのミカエリス定数と最大速度を示す。Fig. 1-1-12A に示したように, 酵素に対する基質の結合は Ca^{2+} の存在に影響されない ($K_m^{\text{app}} = K_m$) ので, これらの式において $K^{\text{ESM}} = K^{\text{EM}}$ とすることができ。

Fig. 1-1-12B は Fig. 1-1-12A の実験結果を式 (1-1-18) と (1-1-19) に従ってプロットし直した結果を示す。このプロットから $1/K^{\text{EM}} = 1.26 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ と $1/K^{\text{ESM}} = 1.13 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ が得られ, 両者の値はほぼ一致するとともに, 第四項において Ca^{2+} 添加による蛍光強度の変化から求めた Ca^{2+} の結合定数 (Fig. 1-1-10) とほぼ一致した。

Fig. 1-1-13A はミセル状 diC_7PC を基質としたときの速度論データの Lineweaver-Burk プロットを示す。単分子分散状 diC_6PC を基質としたときと同様に (Fig. 1-1-12), この場合にも Ca^{2+} 濃度の増加に伴って最大速度は増大したが, ミカエリス定数は変化しなかった。

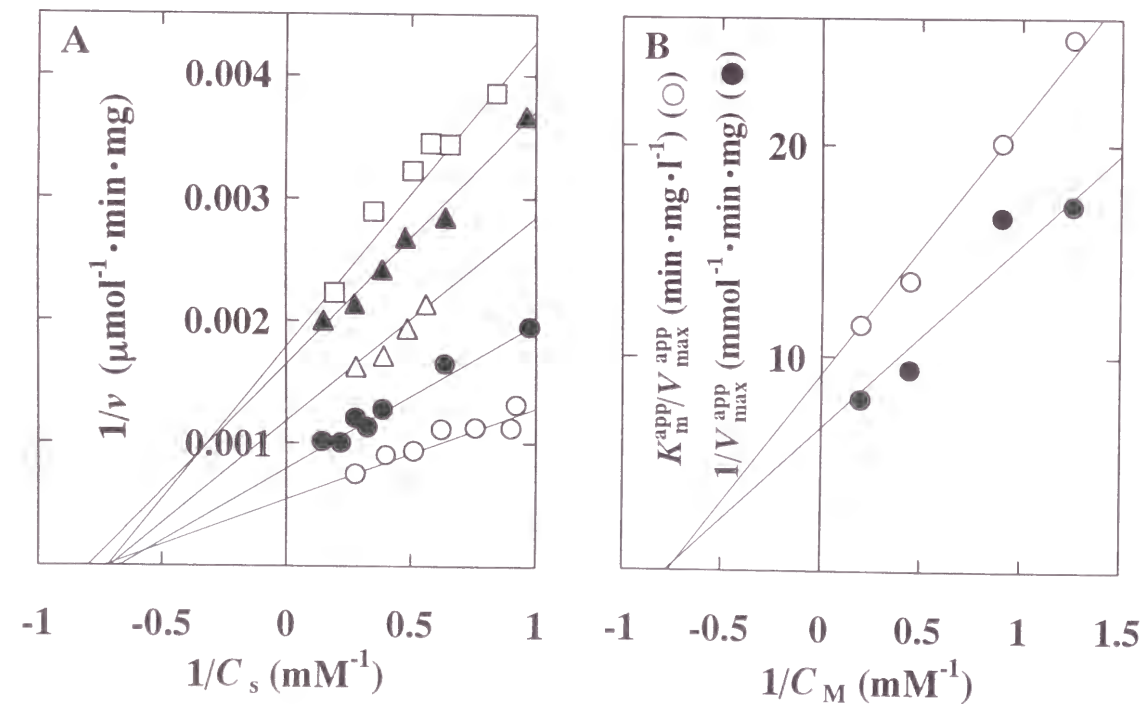


Fig. 1-1-13 Effect of Ca^{2+} on the kinetics of the hydrolysis of micellar diC_7PC , catalyzed by bovine pancreatic PLA_2 at pH 7.5. A; The Lineweaver-Burk plots of the kinetic data in the presence of 0.8 mM (\square), 1.1 mM (\blacktriangle), 2.2 mM (\triangle), 5.0 mM (\bullet), and 20 mM (\circ) Ca^{2+} . B; The reciprocal of the apparent maximum velocity, $1/V_{\text{max}}^{\text{app}}$ (\bullet), and the apparent parameter, $K_m^{\text{app}}/V_{\text{max}}^{\text{app}}$ (\circ), were each plotted as a function of the reciprocal of Ca^{2+} concentration, $1/C_M$, according to Eqs. 1-1-19 and 1-1-18, respectively.

Fig. 1-1-13A で得られた見かけのパラメーターを式 (1-1-18) と (1-1-19) に従ってプロットした結果 (Fig. 1-1-13B), $1/K^{\text{EM}} = 7.64 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ と $1/K^{\text{ESM}} = 7.79 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ が得られ, 両者の値は, 単分子分散状 diC_6PC を基質として求めた $1/K^{\text{EM}}$ の値 (Fig. 1-1-12B) や, 第四項で述べた蛍光測定から求めた $1/K^{\text{EM}}$ の値 (Fig. 1-1-10) とほぼ一致した。

第七項 単分子分散状およびミセル状レシチンを基質としたときの酵素反応パラメータの pH 依存性

基質結合と触媒作用に関与するアミノ酸残基のイオン化状態を明らかにするために, PLA_2 が Ca^{2+} で飽和されている条件下, 単分子分散状およびミセル状レシチンを基質として酵素反応パラメーターの pH 依存性を調べた。

1. 反応中心活性 (k_{cat}) の pH 依存性

Fig. 1-1-14 は触媒中心活性の pH 依存性を示す。 $k_{\text{cat}}^{\text{mon}}$ は単分子分散状 diC_6PC を基質としたときの値であり, $k_{\text{cat}}^{\text{mic}}$ はミセル状 diC_7PC を基質としたときの値を示す。

一定 Ca^{2+} 濃度のもとで得た $k_{\text{cat}}^{\text{mon,app}}$ と $k_{\text{cat}}^{\text{mic,app}}$ の値は, 第四項の Fig. 1-1-10 で求めた種々の pH における Ca^{2+} の結合定数 $K^{\text{EM}} (=K^{\text{ESM}})$ の値を用い, 式 (1-1-19) に従って, Ca^{2+} 飽和の条件下の値である $k_{\text{cat}}^{\text{mon}}$ と $k_{\text{cat}}^{\text{mic}}$ に補正した。

Fig. 1-1-14 に示したように, 単分子分散状基質とミセル状基質のどちらの場合も, pH

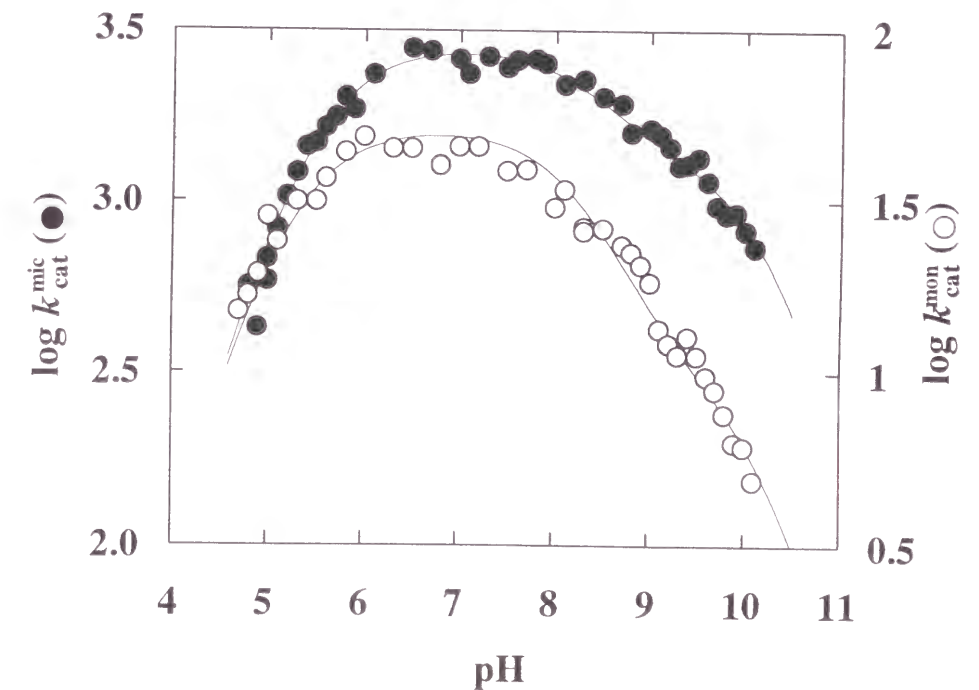


Fig. 1-1-14 pH dependence of the logarithm of k_{cat} for the hydrolysis of monodisperse diC_6PC (\circ) and micellar diC_7PC (\bullet), catalyzed by bovine pancreatic PLA_2 . The solid curves are the theoretical ones constructed according to Eq. 1-1-21 using the parameters given in the text.

6 以下、pH 7 と 9 の間、および pH 9 以上の 3 つの領域に転移が見られた。ミセル状基質の場合の転移は、単分子分散状基質の場合よりもアルカリ性 pH 側へ移行していた。両曲線の pH 6 以下と pH 9 以上の領域で見られる 2 つの大きな転移の傾きはそれぞれ +1 と -1 であり、この結果は、それぞれの転移に関与する 2 つのアミノ酸残基のプロトン化と脱プロトン化により触媒活性が完全に消失することを示す。Fig. 1-1-3 に示した 222 nm における負の楕円率の pH 依存性の結果から判断すると、これら 2 つの転移は酵素タンパク質の変性によるものではないことは明白である。

以前に求められた His 48 の NMR シグナルの pH 依存性³⁹⁾、第三項に示した BPB との反応速度の pH 依存性、および第四項に示した Ca^{2+} との結合定数の pH 依存性から得られた pK 値に基づいて判断すると、pH 6 以下の転移に関与するアミノ酸残基は触媒基 His 48 であり、pH 7 と 9 の間の転移に関与するアミノ酸残基は N 末端 α アミノ基であると考えられる。ウシ膵臓由来 PLA_2 の X 線結晶解析の結果によれば (Fig. 1-1-15)、His 48 のイミダゾール環は Asp 99 と Tyr 52 の側鎖に接近しており、Asp 99 のカルボキシル基の酸素原子は Tyr 52 と Tyr 73 の水酸基と水素結合を形成している。さらに、Tyr 52 の水酸基は 1 分子の水を介して N 末端 α アミノ基と水素結合しているという^{40, 41)}。他方、ウシ膵臓 PLA_2 の NMR による研究では、His 48 の C-2 と C-4 原子のプロトンシグナルはそれぞれ 6.3 と 6.6 ppm に見られるが、His 115 では 7.9 と 6.8 に見られることが報告されている (40℃, pH 7 の条件下)³⁹⁾。テトラペプチド Gly-Gly-His-Ala の His の C-2 と C-4 原子のプロトンシグナルは 8.1 と 7.1 ppm にあるので (35℃, pH 7.0 の条件下)⁴²⁾、ウシ膵臓由来 PLA_2 の His 48 の C-2 プロトンシグナルは一般的な値よりもかなり低磁場へシフトしていると考えられる。結晶解析の結果は、His 48 と Tyr 52 の芳香環の角度が 80°で、中心部分の距離は 0.4 nm 程度

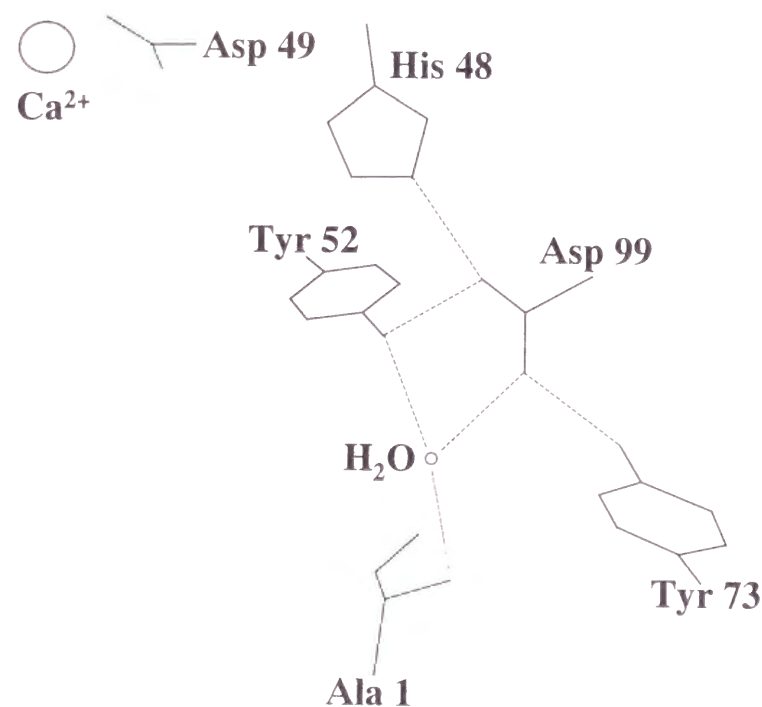
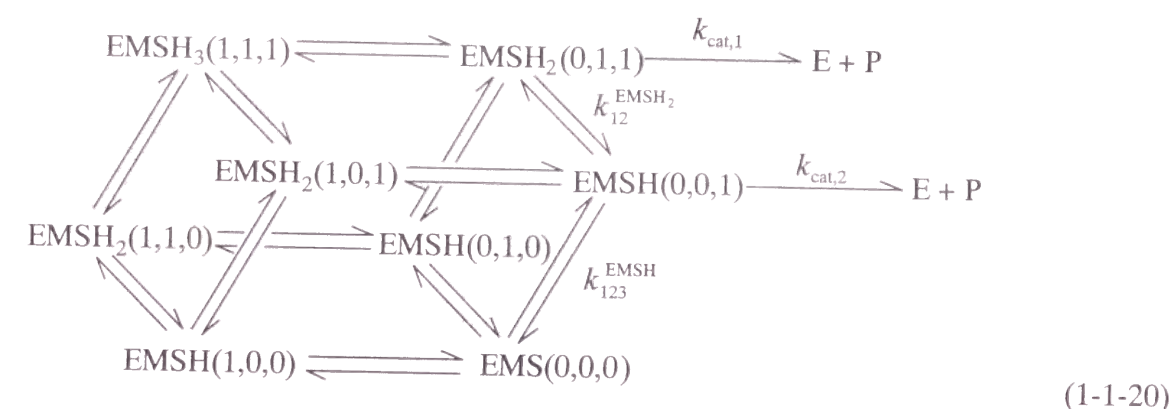


Fig. 1-1-15 The hydrogen bonding network at the active site and the Ca^{2+} binding site in the bovine pancreatic phospholipase A_2 molecule. Dotted line show the hydrogen bonds.

なので (Fig. 1-1-15)、これらの残基間には特別な相互作用があることを示している^{40, 41)}。以上の知見から、pH 9.0 以上の領域に見られる転移は Tyr 52 であると推定した。

触媒中心活性に 3 つの解離基が関与する場合、酵素- Ca^{2+} -基質複合体に関して 8 つのミクロ分子種の存在を考える必要がある： $\text{EMSH}_3(1,1,1)$ 、 $\text{EMSH}_2(1,1,0)$ 、 $\text{EMSH}_2(1,0,1)$ 、 $\text{EMSH}(1,0,0)$ 、 $\text{EMSH}(0,1,1)$ 、 $\text{EMSH}(0,1,0)$ 、 $\text{EMSH}(0,0,1)$ 、および $\text{EMS}(0,0,0)$ 。ここで、括弧内の 1, 2, および 3 番目の数字はそれぞれ、His 48, N 末端 α アミノ基、および Tyr 52 のイオン化状態を示し、1 と 0 はそれぞれの解離基のプロトン化状態と脱プロトン化状態を示す。Fig. 1-1-14 の結果から判断して、これらの分子種の中で、His 48 が脱プロトン化状態で、Tyr 52 がプロトン化状態にある 2 つの分子種、 $\text{EMSH}_2(0,1,1)$ と $\text{EMSH}(0,0,1)$ のみが生成物を産生できると考えられる。それぞれの速度定数を $k_{\text{cat},1}$ と $k_{\text{cat},2}$ とすると、反応のスキームは次のように表すことができる。



このスキームに従えば、ある pH における $k_{\text{cat}}^{\text{mon}}$ (または $k_{\text{cat}}^{\text{mic}}$) の対数は次式で表される。

$$\log k_{\text{cat}}^{\text{mon}} \quad (\text{or} \quad \log k_{\text{cat}}^{\text{mic}}) = \log \frac{A \cdot [\text{H}^+]^2 + B \cdot [\text{H}^+]}{\frac{[\text{H}^+]^3}{K^{\text{EMSH}_3} \cdot K^{\text{EMSH}_2} \cdot K^{\text{EMSH}}} + \frac{[\text{H}^+]^2}{K^{\text{EMSH}_2} \cdot K^{\text{EMSH}}} + \frac{[\text{H}^+]}{K^{\text{EMSH}}} + 1} \quad (1-1-21)$$

ここで、 K^{EMSH_3} 、 K^{EMSH_2} 、および K^{EMSH} はそれぞれ、酵素- Ca^{2+} -基質複合体の His 48, N 末端 α アミノ基、および Tyr 52 からの H^+ のマクロ解離定数を示す。また、A と B は次式により表される定数である。

$$A = \frac{k_{\text{cat},1}}{k_{12}^{\text{EMSH}_2} \cdot k_{123}^{\text{EMSH}}} \quad (1-1-22)$$

$$B = \frac{k_{\text{cat},2}}{k_{123}^{\text{EMSH}}} \quad (1-1-23)$$

$k_{12}^{\text{EMSH}_2}$ と k_{123}^{EMSH} はそれぞれ、 $\text{EMSH}_2(0,1,1)$ 複合体の α アミノ基からの H^+ と、 $\text{EMSH}(0,0,1)$ 複合体の Tyr 52 からの H^+ のミクロ解離定数を示す。

Fig. 1-1-14 に示した実線は、式 (1-1-21) にそれぞれのパラメーターとして、単分子分

散状基質のとき, $pK^{\text{EMSH}_3} = 5.00$, $pK^{\text{EMSH}_2} = 8.40$, $pK^{\text{EMSH}} = 9.50$, $A = 3.55 \times 10^{19} \text{ M}^{-2}\text{min}^{-1}$, および $B = 5.25 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ を代入し, ミセル状基質のとき, $pK^{\text{EMS}_N\text{H}_3} = 5.45$, $pK^{\text{EMS}_N\text{H}_2} = 8.40$, $pK^{\text{EMS}_N\text{H}} = 10.25$, $A = 1.10 \times 10^{22} \text{ M}^{-2}\text{min}^{-1}$, および $B = 3.63 \times 10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ を代入して得られた理論曲線であり, 実験値とよく一致することがわかった. ここで, 単分子分散状基質を用いたときのパラメーターとミセル状基質を用いたときのパラメーターは S と S_N を用いて区別した.

2. 基質との結合定数 ($1/K_m$) の pH 依存性

Fig. 1-1-16 はミカエリス定数の逆数の pH 依存性を示す. $1/K_m^{\text{mon}}$ は単分子分散状 diC₆PC を基質としたときの値であり, $1/K_m^{\text{mic}}$ はミセル状 diC₇PC を基質としたときの値を示す. 第六項で述べたように, どちらの基質の場合にも, 酵素と基質との結合には Ca^{2+} の存在が影響しないので, ここに示す K_m^{mon} と K_m^{mic} (Ca^{2+} 飽和時の値) には, 一定濃度の Ca^{2+} 存在下の実験で求めた $K_m^{\text{mon,app}}$ と $K_m^{\text{mic,app}}$ の値を用いた.

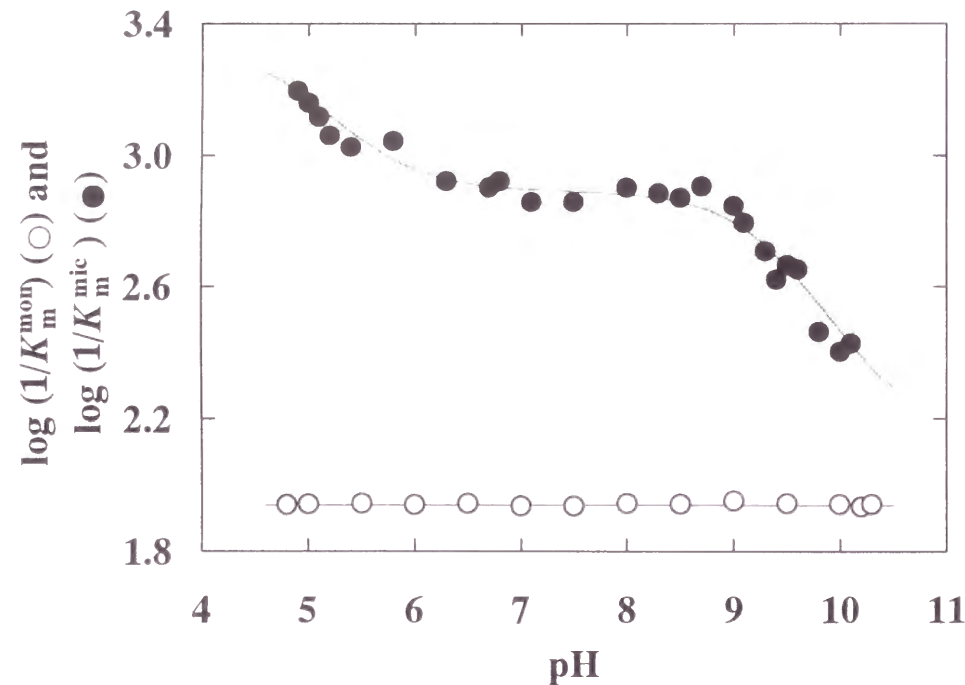
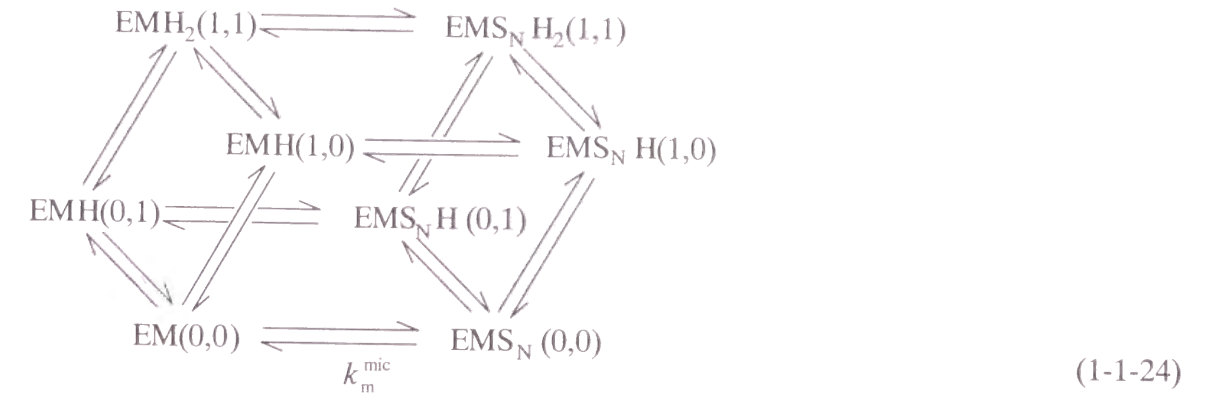


Fig. 1-1-16 pH dependence of the logarithm of $1/K_m$ for the hydrolysis of monodispersed diC₆PC (○) and micellar diC₇PC (●), catalyzed by bovine pancreatic PLA₂. The solid curve is the theoretical one constructed according to Eq. 1-1-25 using the parameters given in the text.

Fig. 1-1-16 の結果から明らかなように, 単分子分散状基質に対する $1/K_m^{\text{mon}}$ の値は, pH 4.7 から 10.5 の範囲では pH に依存しなかった. 他方, ミセル状 diC₇PC の場合には, pH 5.0 と 9.5 近傍の 2 つの領域に転移が見られた. この結果は, 酵素とミセル状基質との結合には 2 つの解離基のイオン化が関与することを示す. そこで, この結果を解析するために次のスキームを用いた.



ここで, $\text{EMH}_2(1,1)$, $\text{EMH}(1,0)$, $\text{EMH}(0,1)$, および $\text{EM}(0,0)$ は酵素- Ca^{2+} 複合体のミクロ分子種を表し, $\text{EMS}_N\text{H}_2(1,1)$, $\text{EMS}_N\text{H}(1,0)$, $\text{EMS}_N\text{H}(0,1)$, および $\text{EMS}_N(0,0)$ は酵素- Ca^{2+} -ミセル状基質複合体のミクロ分子種を表す. 括弧内の数字は 2 つの解離基のイオン化状態を示し, 1 と 0 はそれぞれの解離基がプロトン化状態と脱プロトン化状態であることを表す. 式 (1-1-24) に従えば, ある pH における酵素とミセル状基質との結合定数 ($1/K_m^{\text{mic}}$) は次式で表される.

$$\log \frac{1}{K_m^{\text{mic}}} = \log \frac{\frac{[\text{H}^+]^2}{K^{\text{EMS}_N\text{H}_3} \cdot K^{\text{EMS}_N\text{H}}} + \frac{[\text{H}^+]}{K^{\text{EMS}_N\text{H}}} + 1}{\frac{[\text{H}^+]^2}{K^{\text{EMH}_3} \cdot K^{\text{EMH}}} + \frac{[\text{H}^+]}{K^{\text{EMH}}} + 1} + \log \frac{1}{k_m^{\text{mic}}} \quad (1-1-25)$$

ここで, K^{EMH_3} と K^{EMH} は酵素- Ca^{2+} 複合体中の問題とする 2 つの解離基からの H^+ のマクロ解離定数を示し, $K^{\text{EMS}_N\text{H}_3}$ と $K^{\text{EMS}_N\text{H}}$ は酵素- Ca^{2+} -ミセル状基質複合体中の 2 つの解離基からの H^+ のマクロ解離定数を示す. $1/k_m^{\text{mic}}$ はこの 2 つの解離基が脱プロトン化状態にあるときの $1/K_m^{\text{mic}}$ の極限值を表す.

単分子分散状基質に関する $k_{\text{cat}}^{\text{mon}}$ の pH 依存性曲線を解析したところ (Fig. 1-1-14), 酵素- Ca^{2+} -単分子分散状基質複合体の His 48 と Tyr 52 の pK 値はそれぞれ $pK^{\text{EMSH}_3} = 5.00$ と $pK^{\text{EMSH}} = 9.50$ であった. Fig. 1-1-16 に示したように, 単分子分散状基質に関する $1/K_m^{\text{mon}}$ は pH に依存しなかったため, これらの pK 値は, 基質が結合していない酵素- Ca^{2+} 複合体の時の値 (pK^{EMH_3} と pK^{EMH}) と同じである. 一方, Fig. 1-1-14 のミセル状基質に関する $k_{\text{cat}}^{\text{mon}}$ の pH 依存性曲線を解析したところ, 酵素- Ca^{2+} -ミセル状基質複合体の His 48 と Tyr 52 の pK 値はそれぞれ $K^{\text{EMS}_N\text{H}_3} = 5.45$ と $K^{\text{EMS}_N\text{H}} = 10.25$ であった. $1/K_m^{\text{mic}}$ の pH 依存性曲線でみられた 2 つの転移は, 酵素- Ca^{2+} 複合体がミセル状基質と結合すると, 5 と 9.5 付近に pK 値をもつ 2 つの解離基の pK 値がアルカリ性側へ移行することを示唆する. そこで, His 48 と Tyr 52 の pK 値を式 (1-1-25) に代入し, $1/k_m^{\text{mic}} = 138$ として得られた理論曲線は Fig. 1-1-16 のデータとよく一致した. したがって, ミセル状基質との結合に関与するアミノ酸残基は His 48 と Tyr 52 であると考えられた.

Table 1-1-2 は今回の実験で求めたウシ膵臓由来 PLA₂ の酵素反応に関与すると推定したアミノ酸残基の pK 値を示す。これらの値を用いると、今回行った実験のすべての結果が矛盾することなく説明できたことから、推定したアミノ酸残基が酵素反応に関与することがより明確になった。

Table 1-1-2 Ionization constants of Asp 49, His 48, the α-amino group, Arg -1, and Tyr 52 of bovine pancreatic active- and pro-PLA₂s (E) and their complexes with Ca²⁺ (EM), Ca²⁺ and monodispersed substrate (EMS), and Ca²⁺ and micellar substrate (EMS_N).

	pK value											
	Asp 49		His 48			α-amino group				Tyr 52		
	E	E	EM	EMS	EMS _N	E	EM	EMS	EMS _N	EM	EMS	EMS _N
active-PLA ₂												
BPB reaction rate	—	6.6	—	—	—	9.15	—	—	—	—	—	—
Binding constant for Ca ²⁺	4.1	6.6	5.0	—	—	9.15	8.4	—	—	—	—	—
<i>k</i> _{cat} ^{mon} and 1/ <i>K</i> _m ^{mon} values	—	—	5.0	5.0	—	—	8.4	8.4	—	9.5	9.5	—
<i>k</i> _{cat} ^{mic} and 1/ <i>K</i> _m ^{mic} values	—	—	5.0	—	5.45	—	8.4	—	8.4	9.5	—	10.25
pro-PLA ₂												
BPB reaction rate	—	6.52	—	—	—	10.03	—	—	—	—	—	—
Binding constant for Ca ²⁺	4.15	6.52	5.31	—	—	10.03	9.34	—	—	—	—	—

Gaps (—): not detectable these methods.

第八項 考察

本研究で得られたウシ膵臓由来 PLA₂ に関する実験結果をこれまでに得られているヘビ毒由来 PLA₂ の結果と比較し、I 型と II 型 PLA₂ の触媒作用の共通点と相違点を要約した。

1. BPB による触媒基 His 48 の修飾

Fig. 1-1-17 は、種々の PLA₂ と BPB との反応速度定数の pH 依存性曲線の比較を示す。I 型に属するウシ膵臓、コブラ (*N. naja atra*) 毒^{19, 20)}、およびウミヘビ (*P. australis*) 毒*) 由来 PLA₂ は二相性の pH 依存性曲線を示した。また、同じ I 型に属する他の 2 種類のコブラ (*N. naja kaouthia* と *N. naja siamensis*) 毒¹⁹⁾ とブタ膵臓*) 由来 PLA₂ についても、二相性の曲線が得られている。N 末端 α アミノ基を化学修飾したコブラ毒由来 PLA₂¹⁹⁾ については一相性の曲線を示すことから、BPB との反応に α アミノ基が関与することがわかる。

他方、II 型に属するハブ (*T. flavoviridis*) 毒²⁰⁾ およびクサリヘビ (*V. russelli russelli*) 毒*) 由来 PLA₂ は一相性の曲線を示し、His 48 のイオン化のみが BPB との反応に関与することがわかっている。さらに、N 末端 α アミノ基を修飾したハブ毒由来 PLA₂²⁰⁾ は未修飾酵素と同一の pH 依存性曲線を示すことから、BPB との反応に α アミノ基は関与しないことがわかる。

以上の結果から、PLA₂ の His 48 と BPB との反応には、I 型 PLA₂ では His 48 と N 末端 α アミノ基のイオン化が関与するが、II 型 PLA₂ では His 48 のイオン化のみが関与する

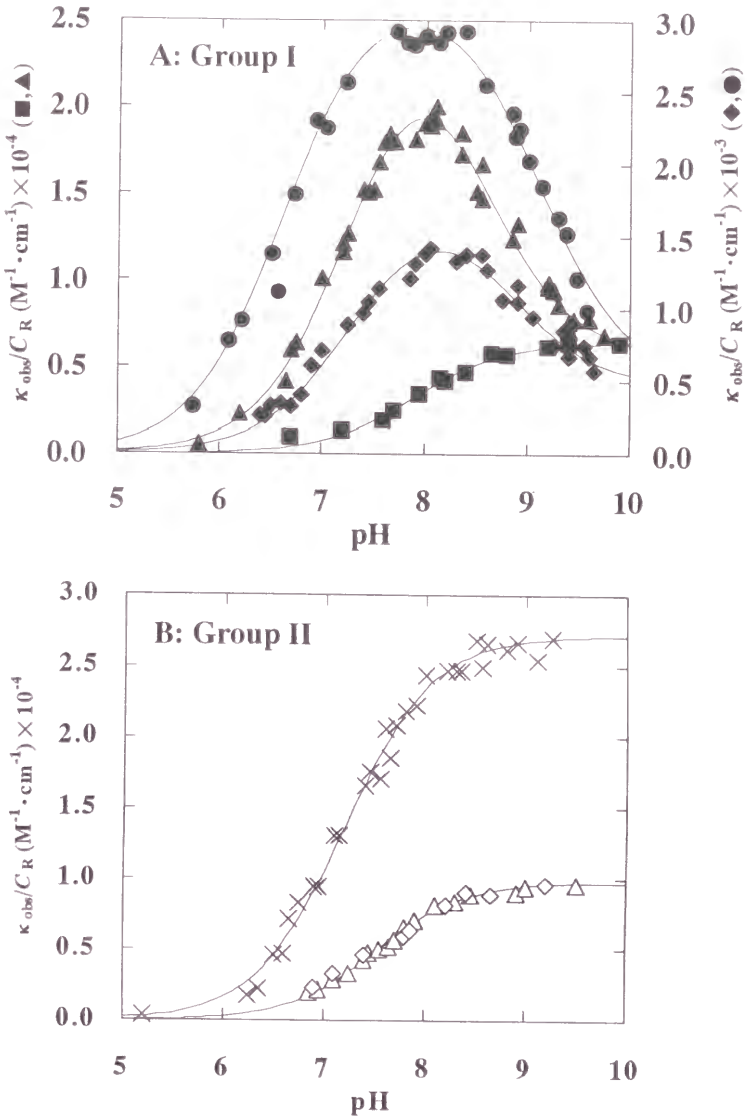


Fig. 1-1-17 pH dependence of the apparent second-order rate constants, κ_{obs}/C_R , of BPB reaction. A, Group I PLA₂s: ●, bovine pancreas; ▲, *N. naja atra* [Ref. 21]; ◆, *P. australis* [Teshima, K., et al., unpublished data]; ■, the α-amino modified *N. naja atra* [Ref. 19]. B, Group II PLA₂s: △, *T. flavoviridis* [Ref. 20]; ×, *V. russelli russelli* [Teshima, K., et al., unpublished data]; ◇, the α-amino modified *T. flavoviridis* [Ref. 20].

ことが確認された。

2. Ca²⁺ の結合様式

Fig. 1-1-18 は、種々の PLA₂ と Ca²⁺ との結合定数の pH 依存性の比較を示す。ヘビ毒由来 PLA₂ に関するこれまでの研究では、I 型に属するコブラ毒由来 PLA₂^{16, 19)} と β-bungarotoxin⁴³⁾ の Ca²⁺ 結合には α アミノ基のイオン化は関与せず、II 型に属するマムシ毒^{17, 18)} とハブ毒²⁰⁾ 由来 PLA₂ の場合には関与するので、この点が I 型と II 型 PLA₂ の大きな相違点であると考えられてきた。しかし今回、ウシ膵臓由来 PLA₂ は I 型に属するにもかかわらず、その Ca²⁺ に対する結合に α アミノ基のイオン化が関与することが示されたので、Ca²⁺ 結合に関して、I 型と II 型 PLA₂ の間に明確な相違点はないことになった。

一方、Fig. 1-1-18 に示すように、アルカリ性 pH 領域において、すべての PLA₂ に対す

*) Teshima, K., et al., unpublished data

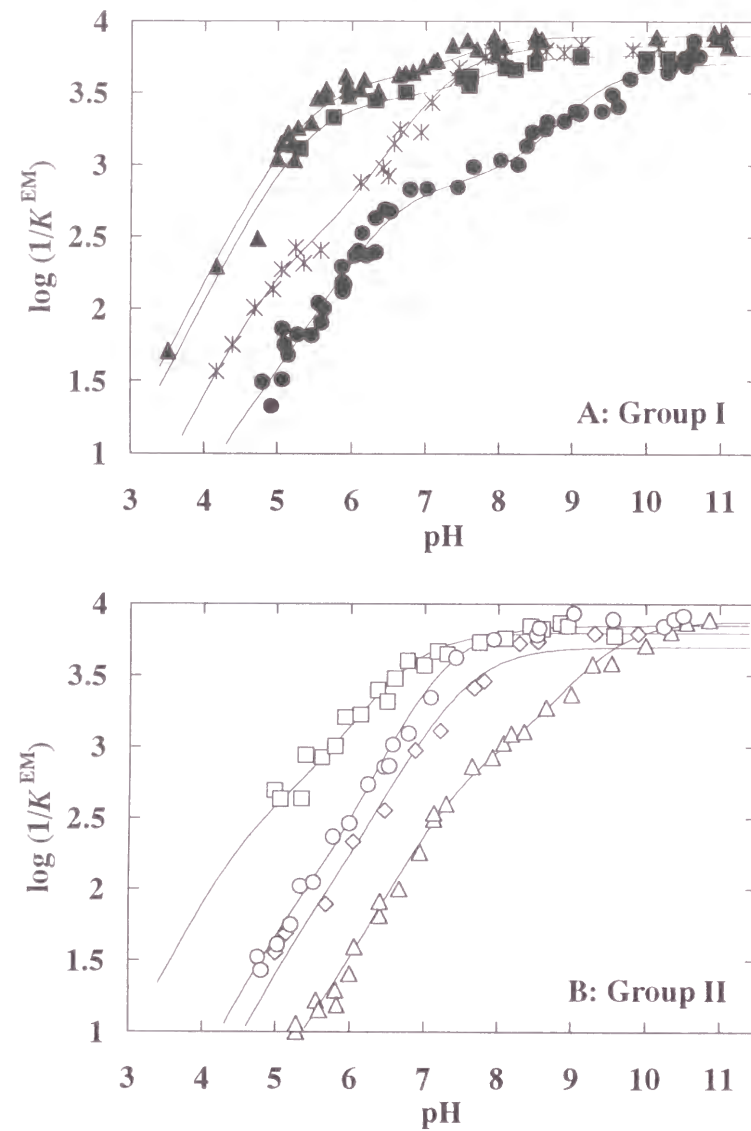


Fig. 1-1-18 pH dependence of the logarithm of the binding constants for Ca^{2+} . A, Group I PLA_2 s: ●, bovine pancreas; ▲, *N. naja atra* [Ref. 16]; ■, the α -amino modified *N. naja atra* [Ref. 19]; ☆, β -bungarotoxin [Ref. 43]. B, Group II PLA_2 s: ○, *A. halys blomhoffii* [Ref. 17]; △, *T. flavoviridis* [Ref. 20]; □, the α -amino modified *A. halys blomhoffii* [Ref. 18]; ◇, the α -amino modified *T. flavoviridis* [Ref. 20].

る Ca^{2+} の結合定数はほぼ一致した。このことから、 Ca^{2+} 結合に関与するアミノ酸残基のすべてが脱プロトン化すると、その結合定数は等しくなるので、 Ca^{2+} の結合様式は、X 線結晶解析で示されたように (Fig. 1-1-7) ¹⁵⁾、すべての PLA_2 に共通であることが明らかになった。

3. PLA_2 による単分子分散状およびミセル状基質の加水分解反応

Table 1-1-3 は、飽和量の Ca^{2+} 存在下で得たウシ膵臓由来 PLA_2 による diC_6PC の加水分解反応のパラメーター (Fig. 1-1-11) を、種々のヘビ毒由来 PLA_2 ²⁰⁻²⁴⁾ のパラメーターと比較した結果を示す。ウシ膵臓 active- PLA_2 と単分子分散状またはミセル状 diC_6PC との複合体の解離定数 (K_m^{mon} と K_m^{mic}) は、ヘビ毒由来 PLA_2 の値よりも数倍高く、触媒中心活性 ($k_{\text{cat}}^{\text{mon}}$ と $k_{\text{cat}}^{\text{mic}}$) は、ヘビ毒由来 PLA_2 の値と比べて、数十倍も低かった。また、ウシ膵臓由

Table 1-1-3 Comparison of the kinetic parameters for five PLA_2 s towards monodispersed and micellar diC_6PC .

Phospholipase A_2	K_m^{mon} (M)	$k_{\text{cat}}^{\text{mon}}$ (min^{-1})	K_m^{mic} (M)	$k_{\text{cat}}^{\text{mic}}$ (min^{-1})	$\frac{1/K_m^{\text{mic}}}{1/K_m^{\text{mon}}}$	$\frac{k_{\text{cat}}^{\text{mic}}}{k_{\text{cat}}^{\text{mon}}}$
Bovine pancreas (pro-)	45.5×10^{-3}	0.02×10^3				
(active)	11.4×10^{-3}	0.04×10^3	28.6×10^{-4}	1.06×10^3	4	26.5
<i>N. naja atra</i> ¹⁾	8.30×10^{-3}	6.79×10^3	8.00×10^{-4}	90.2×10^3	10	13
<i>A. halys blomhoffii</i> ²⁾	7.18×10^{-3}	2.43×10^3	5.80×10^{-4}	58.7×10^3	12	24
<i>T. flavoviridis</i> ³⁾	6.06×10^{-3}	1.48×10^3	4.70×10^{-4}	40.7×10^3	13	28

¹⁾ data cited from Ref. 22; ²⁾ cited from Ref. 23; ³⁾ cited from Ref. 24.

Table 1-1-4 Comparison of the catalytic efficiencies of five PLA_2 s towards monodispersed and micellar diC_6PC .

Phospholipase A_2	$\frac{k_{\text{cat}}^{\text{mon}}}{K_m^{\text{mon}}}$ ($\text{min}^{-1}\text{M}^{-1}$)	$\frac{k_{\text{cat}}^{\text{mic}}}{K_m^{\text{mic}}}$ ($\text{min}^{-1}\text{M}^{-1}$)	$\frac{k_{\text{cat}}^{\text{mic}}/K_m^{\text{mic}}}{k_{\text{cat}}^{\text{mon}}/K_m^{\text{mon}}}$
Bovine pancreas (pro)	0.44×10^3		
(active)	3.5×10^3	3.7×10^5	106
<i>N. naja atra</i> ¹⁾	820×10^3	1100×10^5	134
<i>A. halys blomhoffii</i> ²⁾	340×10^3	1000×10^5	294
<i>T. flavoviridis</i> ³⁾	240×10^3	870×10^5	363

¹⁾ data cited from Ref. 22; ²⁾ cited from Ref. 23; ³⁾ cited from Ref. 24.

来 PLA_2 の触媒効率 ($k_{\text{cat}}^{\text{mon}}/K_m^{\text{mon}}$ と $k_{\text{cat}}^{\text{mic}}/K_m^{\text{mic}}$) もヘビ毒由来 PLA_2 の値と比べて 2~3 桁低く (Table 1-1-4)、膵臓由来 PLA_2 とヘビ毒由来 PLA_2 の間に大きな違いが見られる。

一方、ウシ膵臓由来 PLA_2 のミセル形成に伴う基質との結合力の増大、 $(1/K_m^{\text{mic}})/(1/K_m^{\text{mon}})$ はヘビ毒由来 PLA_2 の値と比べて幾分か小さかったが、これに相当する触媒中心活性の値、 $k_{\text{cat}}^{\text{mic}}/k_{\text{cat}}^{\text{mon}}$ はヘビ毒由来 PLA_2 の値と同程度であった (Table 1-1-3)。

以上の結果から、単分子分散状およびミセル状基質に対する酵素反応パラメーターは、I 型と II 型 PLA_2 の間よりも、膵臓 PLA_2 とヘビ毒由来 PLA_2 との間に著しい違いのあることが明らかになった。

4. PLA_2 による単分子分散状およびミセル状基質の加水分解におよぼす Ca^{2+} の影響

Fig. 1-1-12A と Fig. 1-1-13A に示したように、ウシ膵臓由来 PLA_2 と単分子分散状およびミセル状基質との結合は Ca^{2+} に依存しなかった。同様の結果は、同じ I 型に属するコブラ毒 ^{25, 27)} やブタ膵臓 ^{44, 45)} 由来 PLA_2 についても確認されている。他方、II 型に属するマムシ毒 ²⁵⁾ とハブ毒 ^{25, 27)} 由来 PLA_2 の基質結合は、基質の物理的状态によらず Ca^{2+} の存在により 10 倍以上増大することが示されている。

Fig. 1-1-18 に示したように、アルカリ性 pH 領域における Ca^{2+} の結合定数がすべての PLA_2 でほぼ同一の値であったことから、X 線結晶解析で示された PLA_2 と Ca^{2+} との結合様式は、すべての酵素に共通であると考えられた。しかし、今回の結果からは、 Ca^{2+} の結合

様式は I 型と II 型 PLA₂ でいくらか異なることが示唆された。

この問題については、第二節において、他の PLA₂ を用いる実験や基質アナログの結合実験を行ったので、詳しい考察は第二節で述べる。

5. 単分子分散状およびミセル状基質に対する PLA₂ の結合および触媒作用に關与するアミノ酸残基

Fig. 1-1-19 は、種々の I 型および II 型 PLA₂ について単分子分散状基質を用いたときの k_{cat}^{mon} 、Fig. 1-1-20 はミセル状基質を用いたときの k_{cat}^{mic} の pH 依存性の比較を示す。また、Fig. 1-1-21 と Fig. 1-1-22 はそれぞれ $1/K_m^{mon}$ と $1/K_m^{mic}$ の pH 依存性の比較を示す。ここで、単分子分散状基質にはすべての PLA₂ で diC₆PC を用いたが、ミセル状基質には、ウシ膵臓由来 PLA₂ では diC₇PC を、ヘビ毒由来 PLA₂ では diC₁₆PC と Triton X-100 との混合ミセルを用いている。Fig. 1-1-19 と Fig. 1-1-20 に示したように、I 型に属するウシ膵臓、コブラ毒、およびウミヘビ毒由来 PLA₂ の触媒活性には、どちらの基質の場合にも 3 つのアミノ酸残基のイオン化が関与し、それらの残基は、His 48、N 末端 α アミノ基、および Tyr 52 であることが示唆された^{22, 27)}。しかし、II 型に属するマムシ毒とハブ毒由来 PLA₂ の触媒活性には 2 つのアミノ酸残基 His 48 と Tyr 52 のみが関与し、 α アミノ基は関与しないことがわかった^{23, 24, 26, 27)}。

他方、Fig. 1-1-21 に示したように、単分子分散状基質に対する PLA₂ の結合定数は、マムシ毒由来 PLA₂ を除いて pH に依存しない。この結果は、触媒部位近傍に存在するアミノ酸残基 (His 48、 α アミノ基、Tyr 52) のイオン化状態が単分子分散状基質との結合にあまり重要でないことを示す。マムシ毒由来 PLA₂ の場合には、pH 5.0 と 8.0 の間に 1 つの転移が見られるが、この転移は N 末端の α アミノ基を化学修飾すると消失するので、マムシ毒由来 PLA₂ の場合には α アミノ基が関与することになるが、これはむしろ例外と考えられる。

Fig. 1-1-22 に示したように、ミセル状基質に対する PLA₂ の結合には 2 つのアミノ酸残基 His 48 と Tyr 52 の関与が示唆された。すなわち、酵素-Ca²⁺ 複合体がミセル状基質と結合すると、これらの pK 値は有意にアルカリ性 pH 側に移行する。同様の結果は実験に用いたすべての PLA₂ で得られたので、ミセル状基質との結合に伴うこのような His 48 と Tyr 52 の pK 値の移行はすべての I 型と II 型 PLA₂ に共通の性質であると考えられる。

これまでのミセル状基質に対するヘビ毒由来 PLA₂ の酵素反応速度論の実験にはすべて、Triton X-100 と diC₁₆PC との混合ミセルが基質として用いられてきた。この場合、Triton X-100 による影響も考えられていたが、今回の実験のように、単一の diC₇PC のミセルを用いても混合ミセルのときと同じ結果が得られたことから、Triton X-100 による影響はあまり考慮しなくてもよいことがわかった。

一般に、哺乳類膵臓由来 PLA₂ はヘビ毒由来の PLA₂ に比べて k_{cat} が低く、 K_m は高い (Table 1-1-3)。このような違いはあるものの、ウシ膵臓由来 PLA₂ の酵素反応速度論上の種々の性質がヘビ毒由来の I 型 PLA₂ の性質と基本的に同じであることが明らかになり、I 型 PLA₂ と II 型 PLA₂ は、単に一次構造の違いだけでなく、触媒作用、特に N 末端 α アミノ基の役割に関して、顕著な違いをもつことが明らかになった。

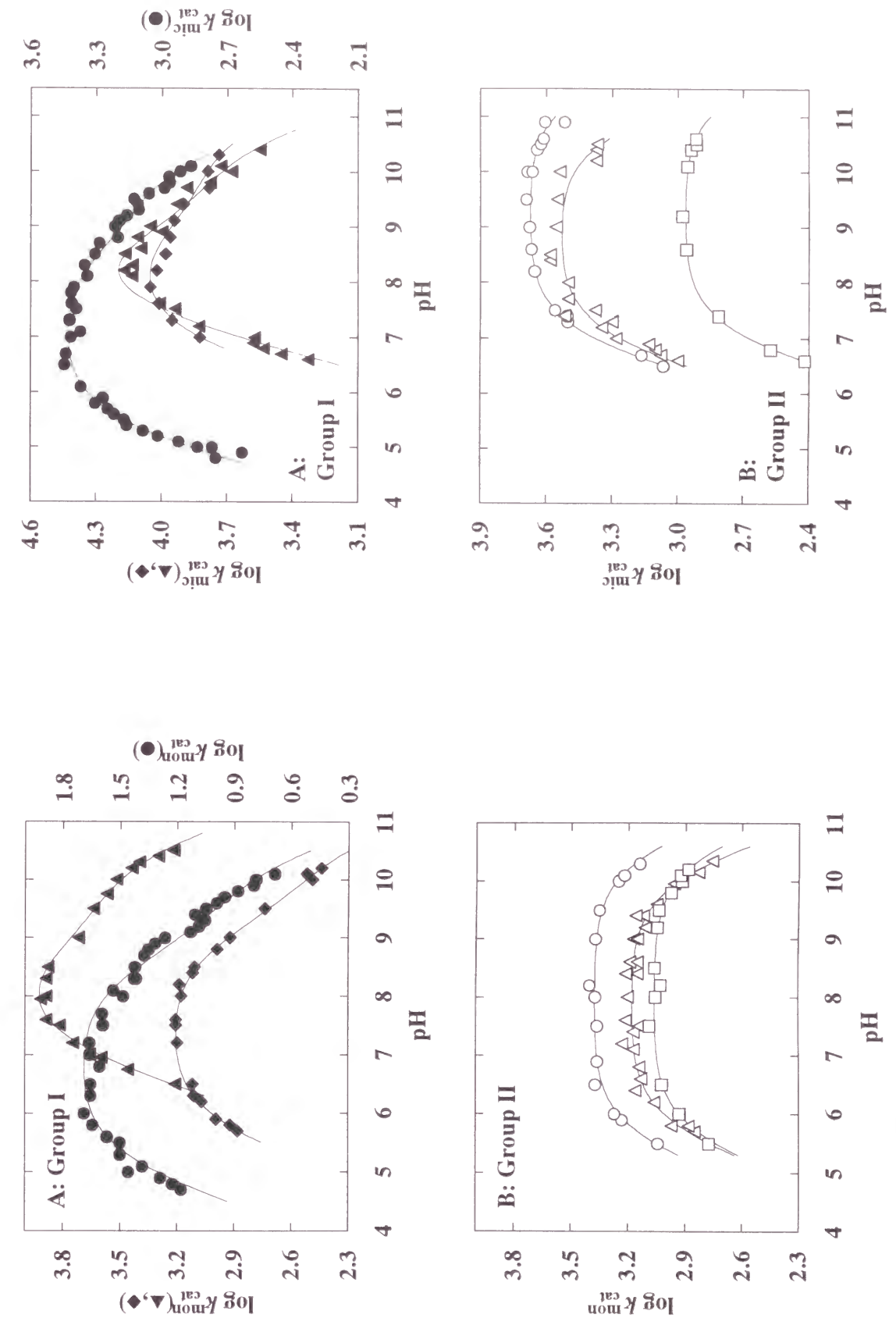


Fig. 1-1-19 pH dependence of the logarithm of k_{cat} for the hydrolysis of monodispersed substrate. A, Group I PLA₂s: ●, bovine pancreas; ▲, *N. naja atra* [Ref. 22]; ◆, *P. australis* [Teshima, K., et al., unpublished data]. B, Group II PLA₂s: ○, *A. halys blomhoffii* [Ref. 23]; △, *T. flavoviridis* [Ref. 24]; □, the α -amino modified *A. halys blomhoffii* [Ref. 23 and 26].

Fig. 1-1-20 pH dependence of the logarithm of k_{cat} for the hydrolysis of micellar substrate. A, Group I PLA₂s: ●, bovine pancreas; ▲, *N. naja atra* [Ref. 27]; ◆, *P. australis* [Teshima, K., et al., unpublished data]. B, Group II PLA₂s: ○, *A. halys blomhoffii* [Ref. 26]; △, *T. flavoviridis* [Ref. 27]; □, the α -amino modified *A. halys blomhoffii* [Ref. 26].

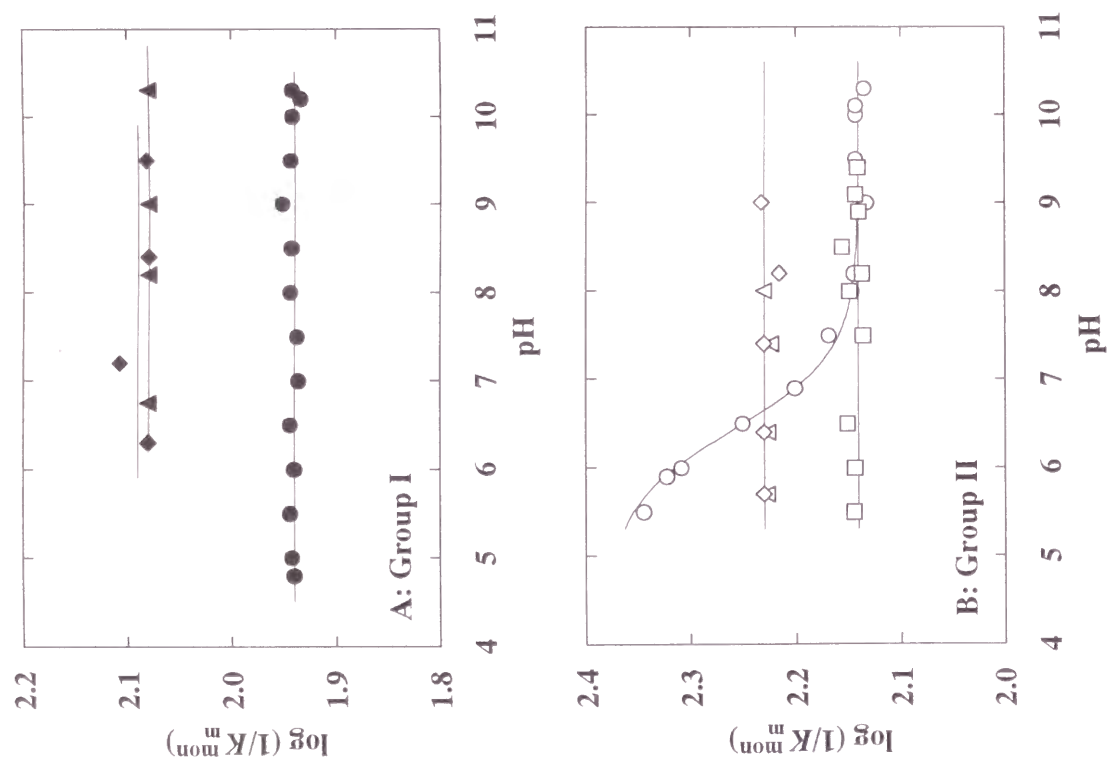


Fig. 1-1-21 pH dependence of the logarithm of $1/K_m$ for the hydrolysis of monodispersed substrate. A, Group I PLA₂s: ●, *P. australis* [Teshima, K., *et al.*, unpublished data]; ▲, *N. naja atra* [Ref. 22]; ◆, *P. australis* [Teshima, K., *et al.*, unpublished data]. B, Group II PLA₂s: ○, *A. halys blomhoffii* [Ref. 23]; △, *T. flavoviridis* [Ref. 24]; □, the α -amino modified *A. halys blomhoffii* [Ref. 23 and 26]; ◇, the α -amino modified *T. flavoviridis* [Ref. 24].

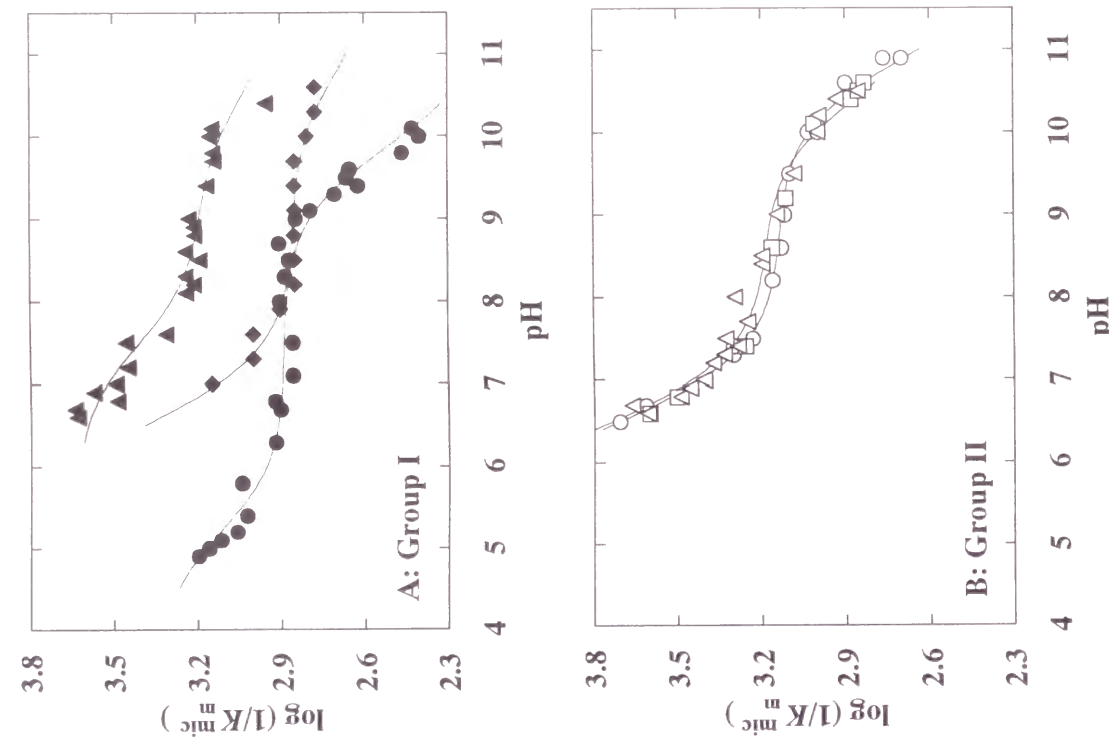


Fig. 1-1-22 pH dependence of the logarithm of $1/K_m$ for the hydrolysis of micellar substrate. A, Group I PLA₂s: ●, *P. australis* [Ref. 27]; ▲, *N. naja atra* [Ref. 27]; ◆, *P. australis* [Teshima, K., *et al.*, unpublished data]. B, Group II PLA₂s: ○, *A. halys blomhoffii* [Ref. 26]; △, *T. flavoviridis* [Ref. 27]; □, the α -amino modified *A. halys blomhoffii* [Ref. 26].

第二節 ホスホリパーゼ A₂ と基質または基質アナログとの結合における Ca²⁺ の役割

—I 型と II 型 PLA₂ の結合様式の共通点と相違点—

第一項 序

第一節第六項と第八項の 4. に示したように、単分子分散状およびミセル状基質と I 型 PLA₂ (ウシ膵臓とコブラ毒由来 PLA₂) の結合は Ca²⁺ の存在により影響されなかったが、II 型 PLA₂ (マムシ毒とハブ毒由来 PLA₂) との結合力は Ca²⁺ の存在により増大した。

Thunnissen らは、アミド基を持つ基質アナログ *R*-2-dodecanoylamino-1-hexanoyl-phosphoglycol (*R*-amide-PG) とブタ膵臓由来 PLA₂ (I 型) との複合体構造を X 線結晶解析により調べ、69 位の Tyr 残基と *R*-amide-PG のリン酸基の酸素原子が水素結合することにより、基質結合に 69 位のアミノ酸残基が関与することを示した (Fig. 1-2-1) ⁴⁷⁾。

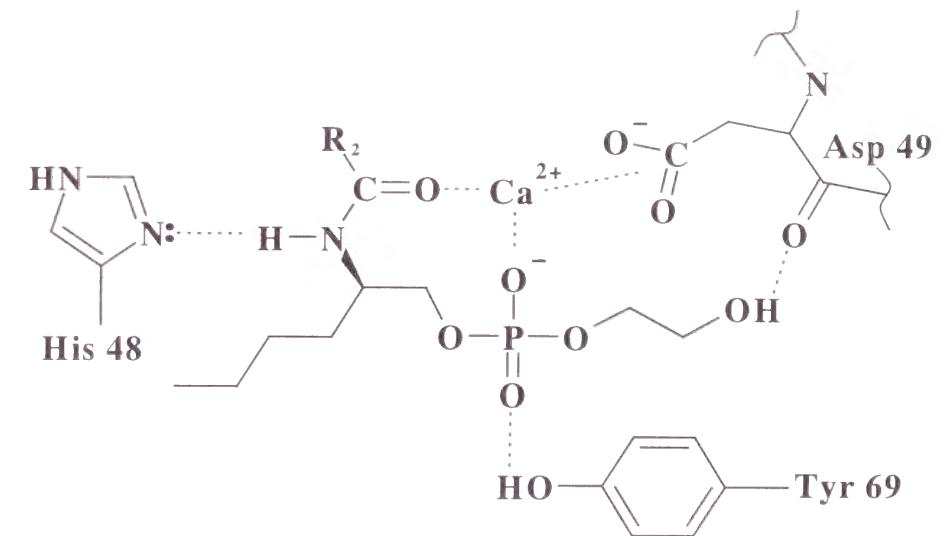


Fig. 1-2-1 Schematic representation of the binding mode of porcine pancreatic PLA₂ with *R*-amide-PG.

基質結合や Ca²⁺ 結合に関与するアミノ酸残基は I 型と II 型 PLA₂ ではほぼ保存されている。我々の研究グループが実験に用いてきた PLA₂ を含めて、I 型 PLA₂ の 69 位のアミノ酸残基は一般に Tyr であり、II 型 PLA₂ では一般に Lys である ⁴⁸⁾。したがって、I 型と II 型 PLA₂ において基質結合の Ca²⁺ 依存性に違いが見られたのは、69 位のアミノ酸残基の違いによる可能性が考えられる。幸いなことに、ウミヘビ (*Pseudechis australis*) 毒由来 PLA₂ (Pa-12A) は I 型に属するが、69 位のアミノ酸残基は例外的に Lys である ⁴⁹⁾。そこで、ウミヘビ (*P. australis*) 毒由来 PLA₂ (Pa-12A) (I 型) とクサリヘビ (*Vipera russelli russelli*) 毒由来 PLA₂ (PLA₂-III) (II 型) について、単分子分散状 diC₆PC を基質とする酵素反応パラメーターにおよぼす Ca²⁺ の影響を調べ比較した。

また、上記の X 線結晶解析の結果は、PLA₂ に結合した Ca²⁺ が *R*-amide-PG のリン酸基とアミド基の酸素原子に直接配位することを示しているが (Fig. 1-2-1)、このことは、I

型 PLA₂ と基質アナログとの結合力が Ca²⁺ の結合により増大することを意味し、真の基質を用いた第一節の結果とは矛盾するように見える。そこで、PLA₂ と種々の基質アナログとの複合体における Ca²⁺ の状態を明らかにするため、初めて複合体構造が明らかにされた amide-PG、その親水性部分を置換した 2-dodecanoylamino-1-hexanolphosphocholine (amide-PC)、および、環状構造を作ることによりアミド水素原子を無くした 3-dodecanoyl-4-phosphatidylcholinohydroxymethyl-2-oxazolidinone (Oxazolidinone-PC) と、I 型および II 型 PLA₂ との結合におよぼす Ca²⁺ の影響を調べた。

Fig. 1-2-2 は、実験に用いた基質と基質アナログの構造を示す。

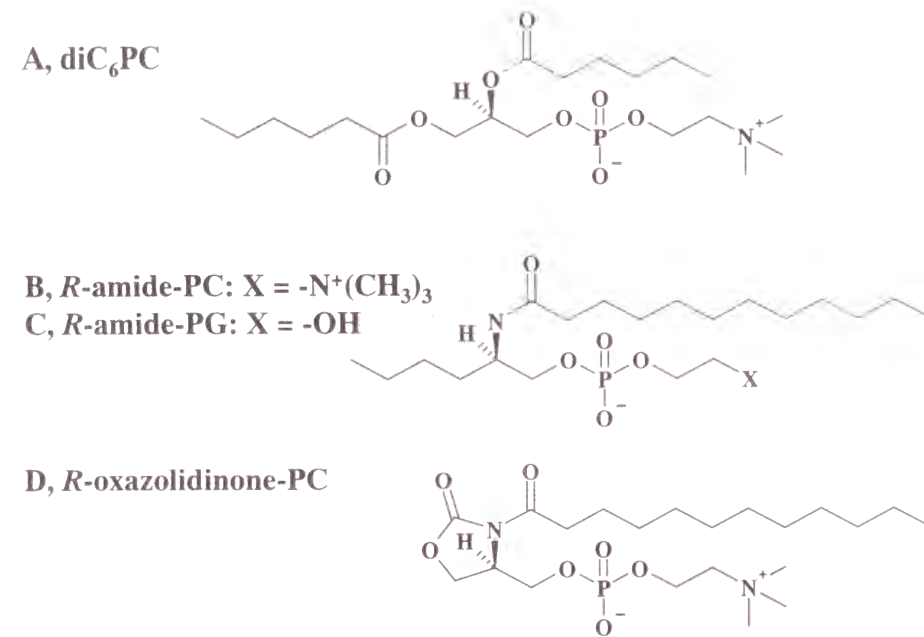


Fig. 1-2-2 Structures of a genuine substrate and substrate analogs. A, 1,2-dihexanoyl-*sn*-glycerophosphocholine (diC₆PC); B, R-2-dodecanoylamino-1-hexanolphosphocholine (R-amide-PC); C, R-2-dodecanoylamino-1-hexanolphosphoglycol (R-amide-PG); D, R-3-dodecanoyl-4-phosphatidylcholinohydroxymethyl-2-oxazolidinone (R-oxazolidinone-PC).

第二項 真の基質と PLA₂ との結合におよぼす Ca²⁺ の影響

Fig 1-2-3 は、種々の Ca²⁺ 濃度におけるウミヘビ毒由来 PLA₂ (I 型) とクサリヘビ毒由来 PLA₂ (II 型) について単分子分散状 diC₆PC を基質としたときの速度論データの Lineweaver-Burk プロットを示す。

酵素と基質との見かけの結合定数 ($1/K_m^{app}$) と Ca²⁺ 濃度 (C_M) との関係は、第一節第六項で示した PLA₂ と Ca²⁺ との相互作用のスキーム (1-1-17) により、次式で表すことができる。

$$\frac{1}{K_m^{app}} = \frac{1}{K_{ES}}(1 - f_M) + \frac{1}{K_{EMS}} f_M \quad (1-2-1)$$

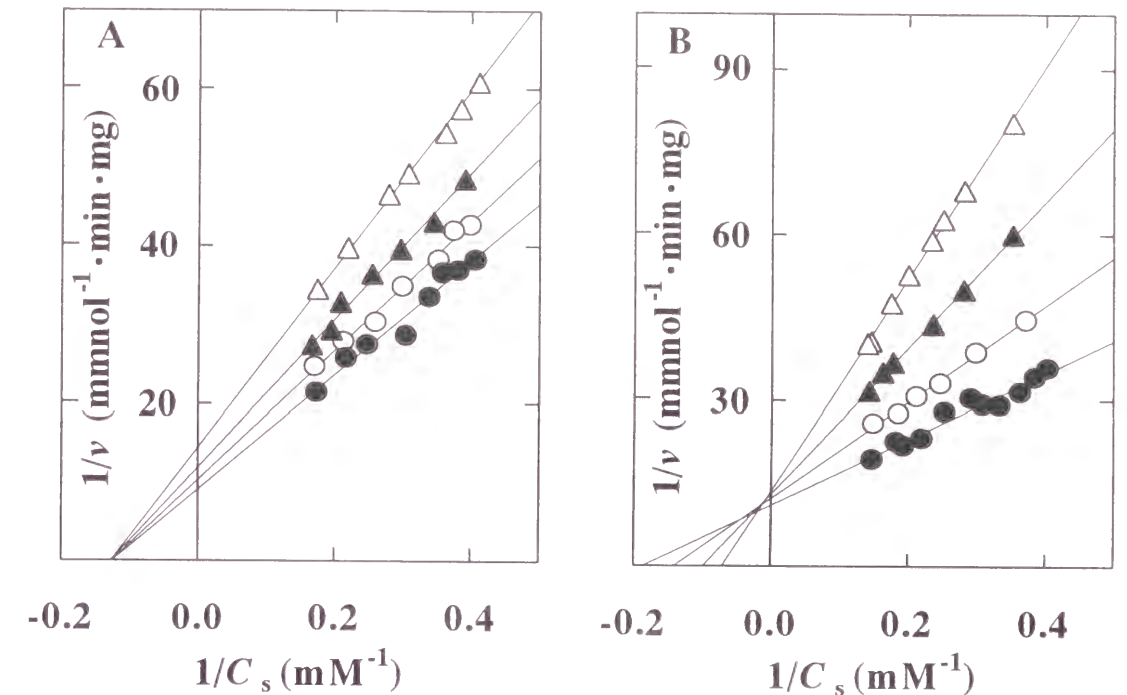


Fig. 1-2-3 Lineweaver-Burk plots of the kinetic data for the hydrolysis of monodispersed diC₆PC catalyzed by *P. australis* (A: Group I) and *V. russelli russelli* (B: Group II) PLA₂s. A: ●, 3.3 mM; ○, 0.22 mM; ▲, 0.081 mM; △, 0.0033 mM Ca²⁺. B: ●, 11 mM; ○, 1.1 mM; ▲, 0.56 mM; △, 0.28 mM Ca²⁺.

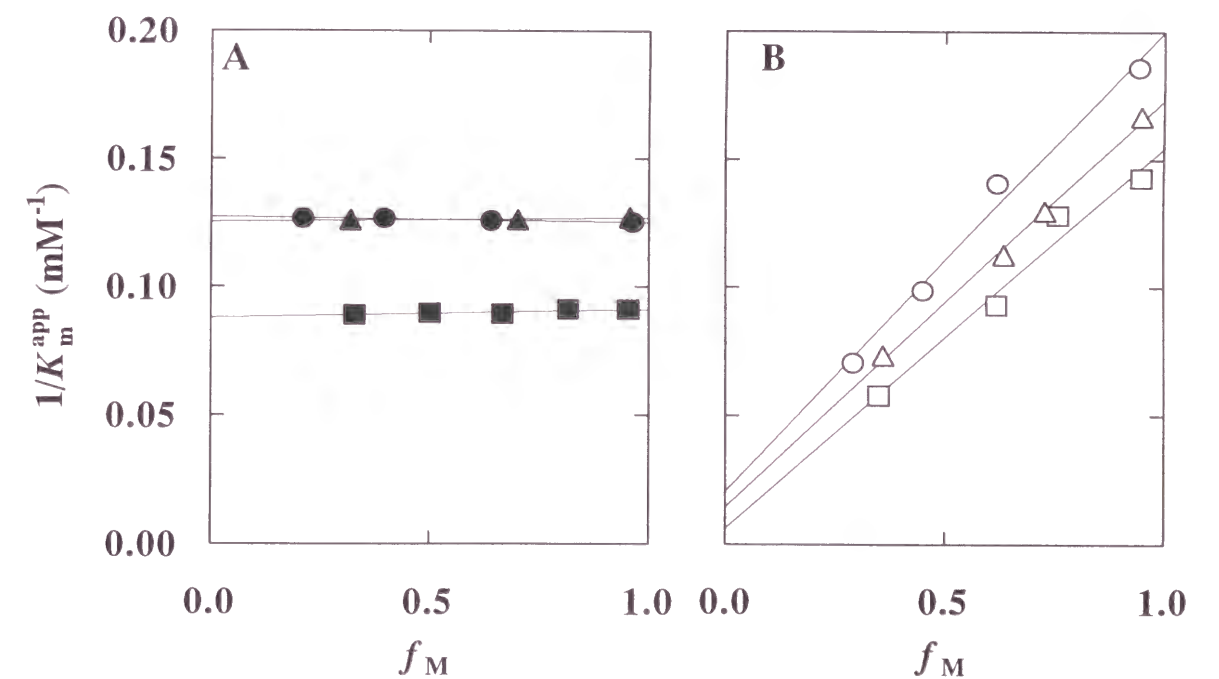


Fig. 1-2-4 Analysis of the Ca²⁺-dependency data for the apparent binding constants of genuine substrate (diC₆PC). A, Group I PLA₂s: ●, *P. australis*; ▲, *N. naja atra*; ■, bovine pancreas. B, Group II PLA₂s: ○, *V. russelli russelli*; △, *T. flavoviridis*; □, *A. halys blomhoffii*. The reciprocals of the apparent Michaelis constants, $1/K_m^{app}$, were plotted as a function of the degree of enzyme saturation with Ca²⁺, f_M , according to Eq. 1-2-1.

ここで、 $1/K^{\text{ES}}$ と $1/K^{\text{EMS}}$ はそれぞれ、 Ca^{2+} 非存在下と飽和量の Ca^{2+} 存在下における PLA_2 と基質との結合定数を表す。 f_M は PLA_2 に対する Ca^{2+} 結合の飽和度であり、次式により求められる。

$$f_M = \frac{C_M K^{\text{EM}}}{1 + C_M K^{\text{EM}}} \quad (1-2-2)$$

ここで、 $1/K^{\text{EM}}$ は PLA_2 に対する Ca^{2+} の結合定数であり、第一節第四項に示した蛍光測定に基づく直接結合実験により求めた。

Fig. 1-2-4 は、Fig. 1-2-3 から求めた $1/K_m^{\text{app}}$ と f_M の関係を式 (1-2-1) に従ってプロットし直した結果を示す。I 型に属するウシ腭臓とコブラ毒由来 PLA_2 、および II 型に属するマムシ毒とハブ毒由来 PLA_2 について同様の実験を行い、その結果を合わせて示した。

その結果、69 位が Lys であるウミヘビ毒由来 PLA_2 (I 型) および 69 位が Tyr である他の I 型 PLA_2 と単分子分散状基質との結合力は Ca^{2+} 濃度に依存しないことがわかった。他方、69 位が Lys であるクサリヘビ毒由来 PLA_2 を含む II 型 PLA_2 と単分子分散状基質との結合力は、 Ca^{2+} の存在により 10 倍以上も増大することがわかった。同様の結果は、ミセル状基質や他の PLA_2 を用いても得られている^{25, 27, 44, 45, 50}。したがって、基質結合の Ca^{2+} 依存性は I 型と II 型 PLA_2 で有意に異なり、その原因は 69 位のアミノ酸残基の違いによるものではないことが明らかになった。

第三項 グリコール含有基質アナログと PLA_2 との結合におよぼす Ca^{2+} の影響

X 線結晶解析によると、amide-PG とブタ腭臓由来 PLA_2 (I 型) との結合には結合 Ca^{2+} を介する相互作用が存在するという (Fig. 1-2-1)⁴⁷。このことから、I 型 PLA_2 と amide-PG との結合力は Ca^{2+} の存在により増大すると予想されるが、これは第二項で示した真の基質との結合実験の結果とは異なる。そこで、I 型および II 型に属する種々の PLA_2 と amide-PG との結合におよぼす Ca^{2+} の影響を調べた。

Fig. 1-2-5 は、一定濃度の Ca^{2+} 存在下、*rac*-amide-PG の存在下と非存在下におけるウミヘビ毒 (I 型) とクサリヘビ毒由来 PLA_2 (II 型) について単分子分散状 diC_6PC を基質としたときの速度論データの Lineweaver-Burk プロットを示す。真の基質 (diC_6PC) と基質アナログ (*rac*-amide-PG) の cmc はそれぞれ 13.6^{16,36)} と 0.22⁵¹⁾ mM なので、この実験条件下の基質と基質アナログはともに単分子分散状態にあると考えられる。Fig. 1-2-5 の結果から、*rac*-amide-PG はどちらの PLA_2 による加水分解反応をも拮抗的に阻害することがわかった。

阻害型式が拮抗阻害なので、阻害定数の逆数、すなわち PLA_2 と単分子分散状 *rac*-amide-PG との結合定数 ($1/K_i^{\text{app}}$) は次式で示される。

$$\frac{1}{K_i^{\text{app}}} = \frac{K_m^{\text{obs}} - 1}{C_i} \quad (1-2-3)$$

ここで、 K_m^{obs} と K_m^{app} はそれぞれ、一定濃度の Ca^{2+} 存在下における *rac*-amide-PG の存在下と非存在下のミカエリス定数を表し、 C_i は遊離の基質アナログの平衡濃度を表す。

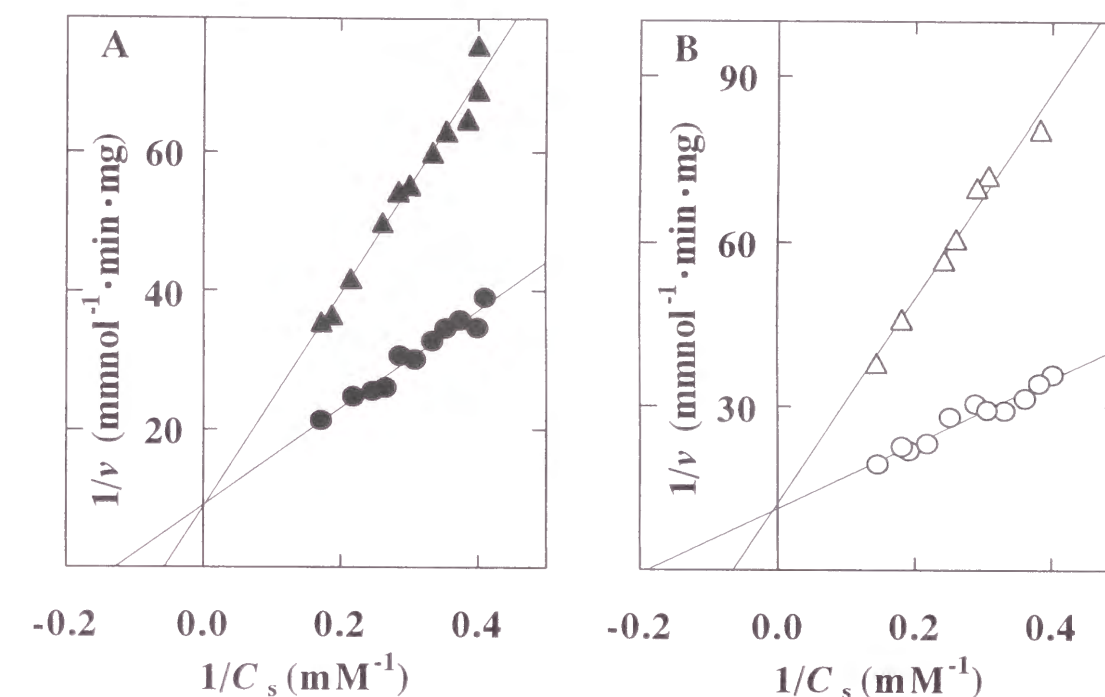


Fig. 1-2-5 Lineweaver-Burk plots of the kinetic data for the hydrolysis of monodispersed diC_6PC catalyzed by *P. australis* (A: Group I) and *V. russelli russelli* (B: Group II) PLA_2 s in the absence (circles) and presence (triangles) of *rac*-amide-PG.

同様の実験を種々の Ca^{2+} 濃度で行い、 $1/K_i^{\text{app}}$ の Ca^{2+} 濃度依存性データを、真の基質の場合と同様に、次式を用いて解析した。

$$\frac{1}{K_i^{\text{app}}} = \frac{1}{K^{\text{EI}}} \cdot (1 - f_M) + \frac{1}{K^{\text{EMI}}} \cdot f_M \quad (1-2-4)$$

ここで、 $1/K^{\text{EI}}$ と $1/K^{\text{EMI}}$ は Ca^{2+} の非存在下と飽和量の Ca^{2+} 存在下における PLA_2 と *rac*-amide-PG の結合定数を表す。 f_M は PLA_2 に対する Ca^{2+} 結合の飽和度であり、それは式 (1-2-2) から求められる。

Fig. 1-2-6 は、Fig. 1-2-5 から求めた $1/K_i^{\text{app}}$ と f_M の関係を式 (1-2-4) に従ってプロットし直した結果を示す。I 型に属するウシ腭臓とコブラ毒由来 PLA_2 、および II 型に属するマムシ毒とハブ毒由来 PLA_2 についても同様の実験を行い、その結果を合わせて示した。これより、すべての PLA_2 に対する単分子分散状 *rac*-amide-PG の結合力は、 PLA_2 の種類により強弱の差はあるものの、 Ca^{2+} の存在により増大することがわかった。

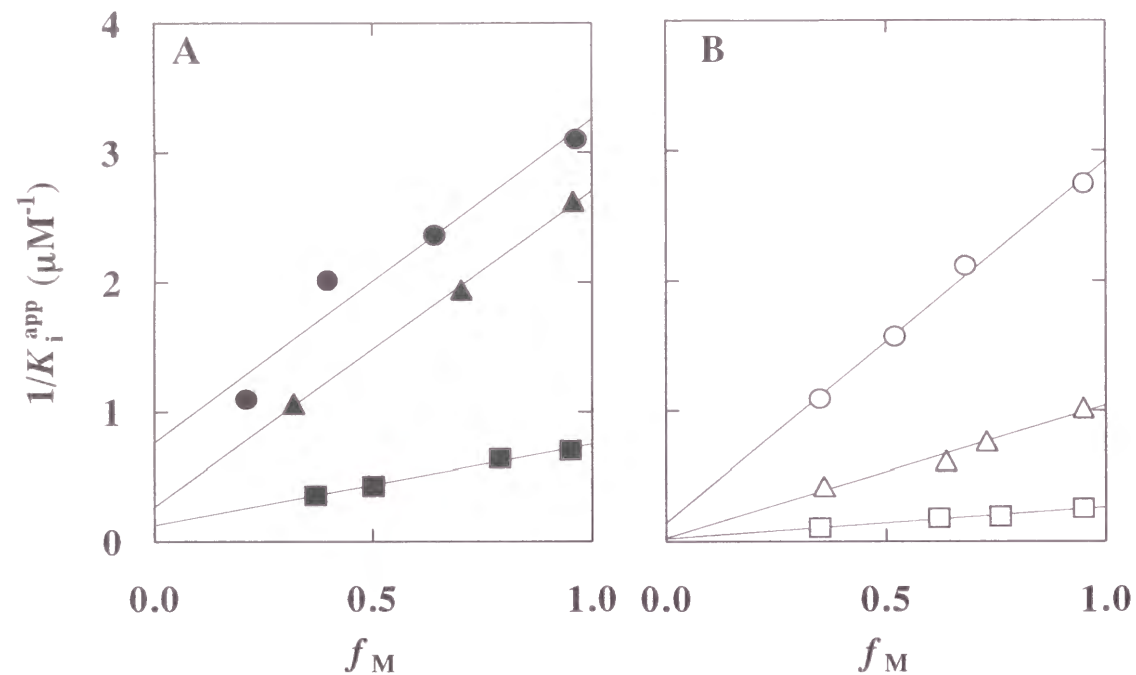


Fig. 1-2-6 Analysis of the Ca^{2+} -dependency data for the apparent binding constants of *rac*-amide-PG. A, Group I PLA_2 s: ●, *P. australis*; ▲, *N. naja atra*; ■, bovine pancreas. B, Group II PLA_2 s: ○, *V. russelli russelli*; △, *T. flavoviridis*; □, *A. halys blomhoffii*. The reciprocals of the apparent inhibition constants, $1/K_i^{\text{app}}$, were plotted as a function of the degree of enzyme saturation with Ca^{2+} , f_M , according to Eq. 1-2-4.

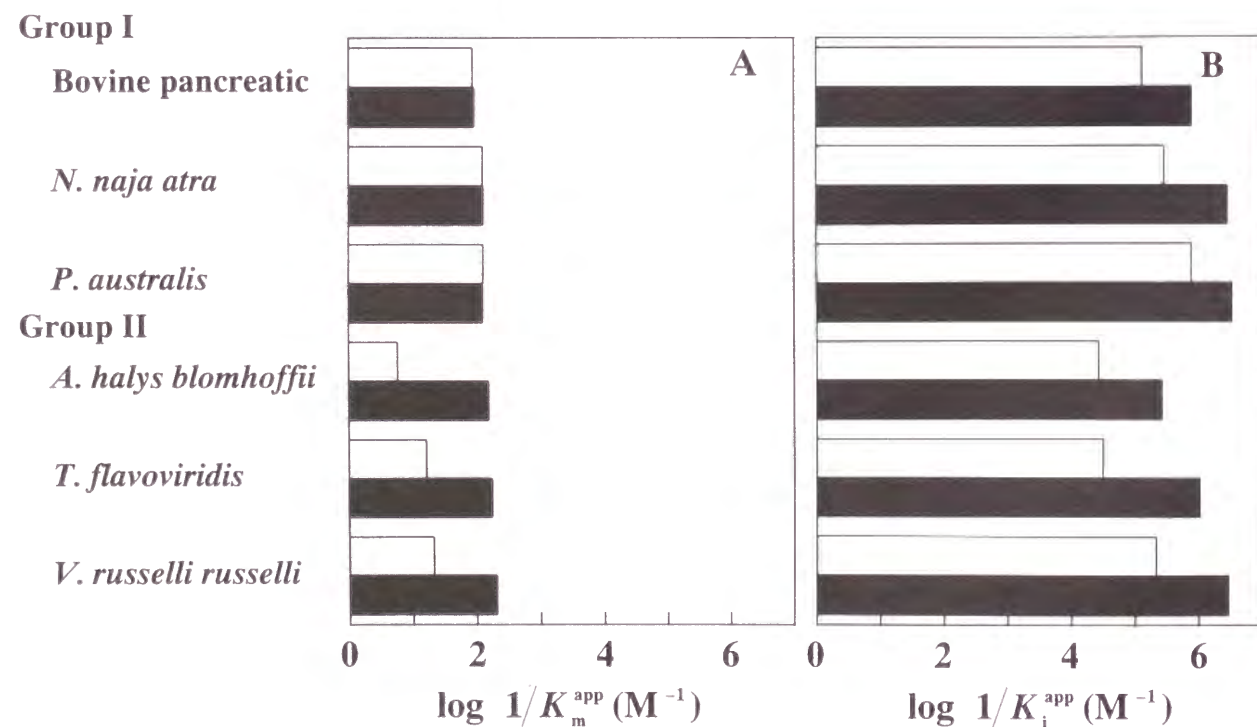


Fig. 1-2-7 The binding constants of monodispersed genuine substrate (diC_6PC), $1/K_m^{\text{app}}$, (A) and *rac*-amide-PG, $1/K_i^{\text{app}}$, (B) to various Group I and II PLA_2 s in the presence (filled bars) and absence (open bars) of Ca^{2+} .

Fig.1-2-7 は、ウシ膵臓 PLA_2 および 5 種類のヘビ毒由来 PLA_2 と単分子分散状 diC_6PC および *rac*-amide-PG との結合におよぼす Ca^{2+} の影響の要約を示す. I 型 PLA_2 において、真の基質と *rac*-amide-PG との結合の Ca^{2+} 依存性は明らかに異なることがわかった.

次に、単分子分散状 *R*- または *S*-amide-PG とウシ膵臓 (I 型) またはマムシ毒由来 PLA_2 (II 型) との結合におよぼす Ca^{2+} の影響を調べた結果 (Table 1-2-1), *R* 体 (天然のリン脂質と同じ立体配置) と PLA_2 との結合力はラセミ体との結合の場合と同様に Ca^{2+} の存在により増大したが、*S* 体との結合では Ca^{2+} による顕著な影響は見られなかった. *R* 体の結合力は *S* 体の結合力に比べて 10 倍以上も大きいので、ラセミ体で得られた結果は *R* 体の結合を反映していると考えられる. したがって、I 型 PLA_2 の真の基質と基質アナログとの結合の Ca^{2+} 依存性の違いは、基質アナログにラセミ体を用いたために生じたのではないことがわかった.

Table 1-2-1 The binding constants of *R*- and *S*-amide-PG, $1/K_i^{\text{app}}$, to bovine pancreas and *A. halys blomhoffii* PLA_2 s in the absence and presence of Ca^{2+} .

	$1/K_i^{\text{app}} \times 10^4 (\text{M}^{-1})$		$K^{\text{EI}}/K^{\text{EMS}}$ ratio
	- Ca^{2+} ($1/K^{\text{EI}}$)	+ Ca^{2+} ($1/K^{\text{EMI}}$)	
Bovine pancreas			
(<i>R</i>)-analog	8.4 ± 12.0	92.5 ± 30.0	11
(<i>S</i>)-analog	0.1 ± 0.3	3.6 ± 0.6	3.3
<i>A. halys blomhoffii</i>			
(<i>R</i>)-analog	5.0 ± 15.3	73.6 ± 37.6	15
(<i>S</i>)-analog	1.7 ± 0.1	1.9 ± 0.3	1.1

第四項 コリン含有基質アナログによる PLA_2 の阻害

Fig. 1-2-7 の結果から明らかなように、 PLA_2 に対する単分子分散状 *rac*-amide-PG の結合力は、どの PLA_2 においても、単分子分散状 diC_6PC の結合力よりも 3~4 桁大きい. X 線結晶解析によれば、この基質アナログのアミド基は PLA_2 の触媒基 His 48 の側鎖と水素結合し、アナログ分子のグリコール基は Asp 49 の主鎖のカルボニル基と水素結合するという (Fig. 1-2-1) ⁴⁷⁾. しかし、真の基質は基質アナログと部分構造が異なるので、 PLA_2 との複合体においてこのような水素結合は形成しない. したがって、この基質アナログの水素結合の形成は PLA_2 と基質アナログの結合力を増大させる原因であり、I 型 PLA_2 で見られた真の基質と amide-PG との結合の Ca^{2+} 依存性の違いの原因かもしれない. そこで、amide-PG のグリコール基の代わりにコリン基をもつ amide-PC および、環状構造を作りアミドプロトン無くした oxazolidinone-PC (Fig. 1-2-2) を用いて同様の実験を行った.

飽和量の Ca^{2+} 存在下、ウシ膵臓とコブラ毒由来 PLA_2 (I 型), およびマムシ毒由来 PLA_2 (II 型) による単分子分散状 diC_6PC の加水分解反応におよぼす単分子分散状基質アナログ

(*R*- および *S*-amide-PC と *R*- および *S*-oxazolidinone-PC) の影響を調べた。

Fig. 1-2-8 は 2.8 mM diC₆PC の存在下, 基質アナログの存在下と非存在下における初速度 (v および v_0) の比である相対活性 (v/v_0) を基質アナログの濃度 (C_i) に対してプロットした結果を示す. oxazolidinone-PC による阻害は amide-PC による阻害と比べて弱いことがわかった. また, *R* 体の阻害の程度は, *S* 体よりも強いことがわかった。

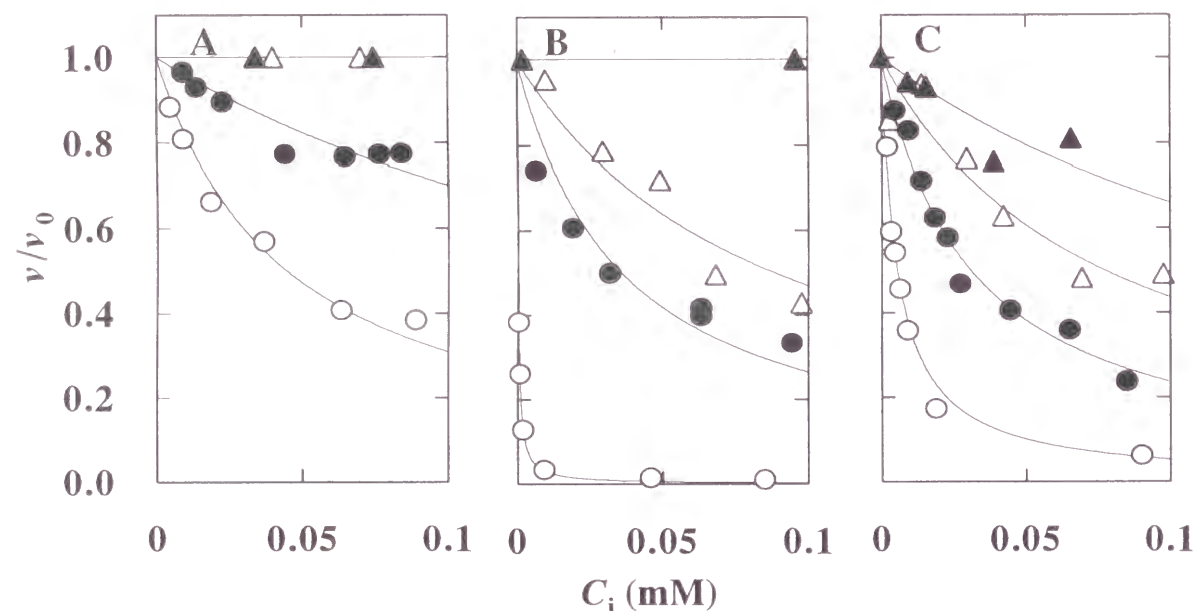


Fig. 1-2-8 Inhibitions of bovine pancreas (A) and *N. naja atra* (B) PLA₂s (Group I) and *A. halys blomhoffii* (C) PLA₂ (Group II) by substrate analogs *R*-amide-PC (○), *S*-amide-PC (△), *R*-oxazolidinone-PC (●), and *S*-oxazolidinone-PC (▲) toward monodispersed diC₆PC at its fixed concentration. The solid curves are the theoretical ones constructed according to Eq. 1-2-5.

Fig. 1-2-9 は, 飽和量の Ca²⁺ 存在下, *R*-amide-PC と *R*-oxazolidinone-PC の存在下および非存在下のコブラ毒 (I 型) とマムシ毒 (II 型) 由来 PLA₂ について, 単分子分散状 diC₆PC を基質としたときの速度論データの Lineweaver-Burk プロットを示す. これら 2 つの基質アナログはどちらの PLA₂ の加水分解反応をも拮抗的に阻害したので, 構造の一部が真の基質と異なるにもかかわらず, 酵素の触媒部位に結合すると考えられた。

PLA₂ と基質アナログとの結合定数 ($1/K_i^{app}$) は, Fig. 1-2-9 の結果から第三項の式 (1-2-3) に従って求めることができる. しかし, 阻害型式が拮抗阻害なので, Fig. 1-2-8 のデータを用いて次式に従って求めることもできる。

$$\frac{v}{v_0} = \frac{1}{1 + \frac{C_i K_i^{app}}{1 + C_s/K_m^{app}}} \quad (1-2-5)$$

ここで K_m^{app} は Fig. 1-2-9 から求めることができる基質アナログ非存在下でのミカエリス定数であり, C_s は基質濃度 2.8 mM である。

Table 1-2-2 は, Fig. 1-2-9 (Lineweaver-Burk プロット) のデータをもとに式 (1-2-3) に

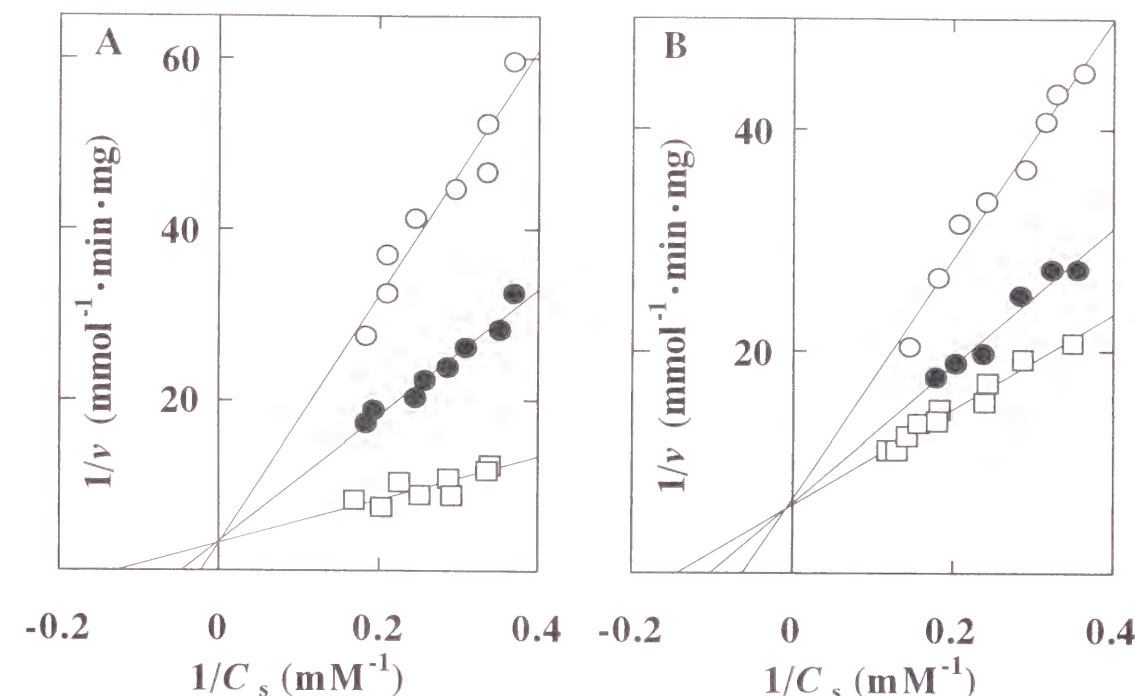


Fig. 1-2-9 Lineweaver-Burk plots of the kinetic data for the hydrolysis of monodispersed diC₆PC catalyzed by *N. naja atra* (A: Group I) and *A. halys blomhoffii* (B: Group II) PLA₂s in the absence (□) and presence of *R*-amide-PC (○) and *R*-oxazolidinone-PC (●).

Table 1-2-2 Binding constants of *R*-amide-PC and *R*-oxazolidinone-PC, $1/K_i^{app}$, for *N. naja atra* and *A. halys blomhoffii* PLA₂s estimated from the Lineweaver-Burk plots at constant analog concentrations and from the analog-concentration dependence plots at constant substrate (diC₆PC) concentrations.

	$1/K_i^{app} \times 10^{-4} (M^{-1})$	
	<i>R</i> -amide-PC	<i>R</i> -oxazolidinone-PC
<i>N. naja atra</i> (Group I)		
Lineweaver-Burk plots ¹⁾	509.2 ± 40.6	6.2 ± 0.6
Analog concentration dependence plots ²⁾	449.2 ± 13.4	3.8 ± 0.4
<i>A. halys blomhoffii</i> (Group II)		
Lineweaver-Burk plots ¹⁾	59.3 ± 0.7	9.8 ± 0.7
Analog concentration dependence plots ²⁾	26.0 ± 1.4	4.5 ± 0.2

¹⁾ The values of $1/K_i$ were determined from Eq. 1-2-3 and Fig. 1-2-9.

²⁾ The values of $1/K_i$ were determined from Eq. 1-2-5 and Fig. 1-2-8.

従って求めた K_i^{app} と, Fig. 1-2-8 (基質アナログ濃度依存性プロット) のデータをもとに式 (1-2-5) に従って求めた K_i^{app} の比較を示す. どちらの解析方法を用いてもほぼ等しい K_i^{app} 値が得られた。

Rogers らは⁵²⁾, 単分子分散状の基質や基質アナログを含む両親媒性物質が PLA₂ の触媒部位以外の部位に結合することにより, 単分子分散状の拮抗阻害剤と PLA₂ との見かけ

の結合力を増大させることがあることを示した。すなわち、基質の濃度もしくは基質アナログの濃度が異なれば、阻害の強さが異なることがあるという。しかし、基質濃度を变化させて行う Lineweaver-Burk プロットと、阻害剤濃度を变化させて行う実験から今回求めた阻害定数はほぼ同じ値であり (Table 1-2-2), 上記のような効果は観測されなかった。

第五項 コリン含有基質アナログと PLA₂ との結合におよぼす Ca²⁺ の影響

第三項においてグリコール含有基質アナログについて行った実験と同様に、PLA₂ とコリン含有基質アナログとの結合の Ca²⁺ 依存性を調べ、そのデータを式 (1-2-4) に従って解析した (Fig. 1-2-10)。その結果、*R*-oxazolidinone-PC のコブラ毒由来 PLA₂ (I 型) との結合は Ca²⁺ 濃度に依存しなかったが、マムシ毒由来 PLA₂ (II 型) との結合力は Ca²⁺ の存在により増大した。他方、*R*-amide-PC の結合力はどちらの PLA₂ においても Ca²⁺ の存在により増大した。

Fig 1-2-11 は単分子分散状 diC₆PC, *R*-oxazolidinone-PC, *rac*-amide-PG, および *R*-amide-PC とコブラ毒由来 PLA₂ およびマムシ毒由来 PLA₂ との結合におよぼす Ca²⁺ の影響の要約を示す。*R*-oxazolidinone-PC は真の基質と同じ傾向を示し、*R*-amide-PC は *rac*-amide-PG と同じ傾向を示した。

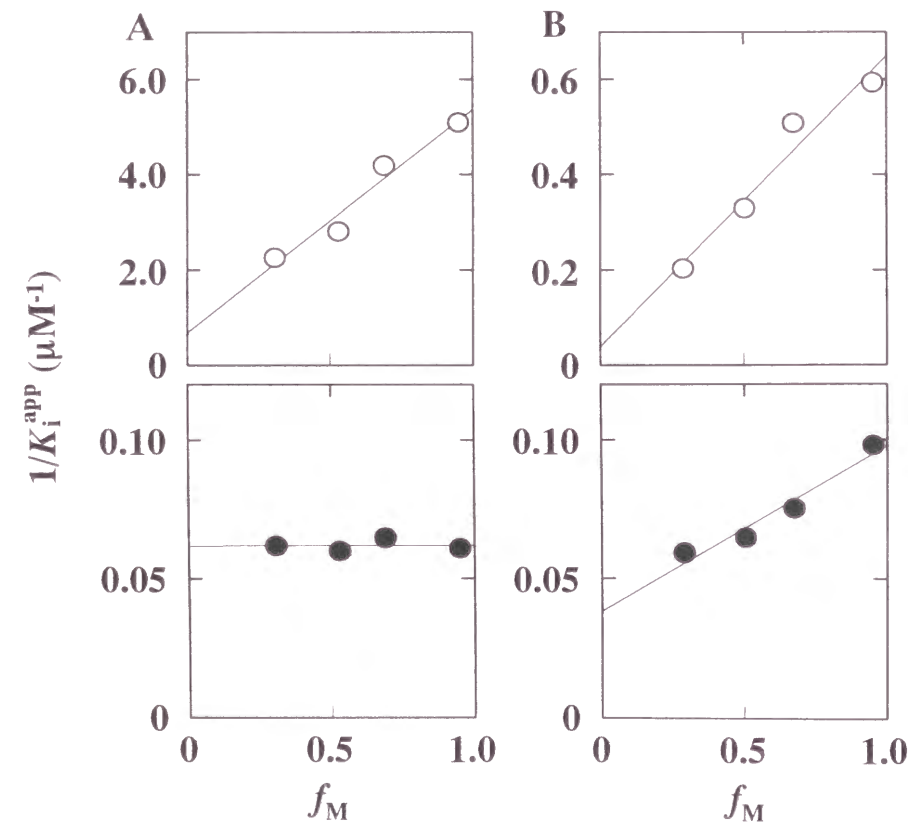


Fig. 1-2-10 Analysis of Ca²⁺-dependence data for the apparent binding constants of *R*-amide-PC (○) and *R*-oxazolidinone-PC (●). A: *N. naja atra* PLA₂ (Group I). B: *A. halys blomhoffii* PLA₂ (Group II). The reciprocals of the apparent inhibition constants 1/*K_i^{app}*, were plotted as a function of the degree of enzyme saturation with Ca²⁺, *f_M*, according to Eq.1-2-4.

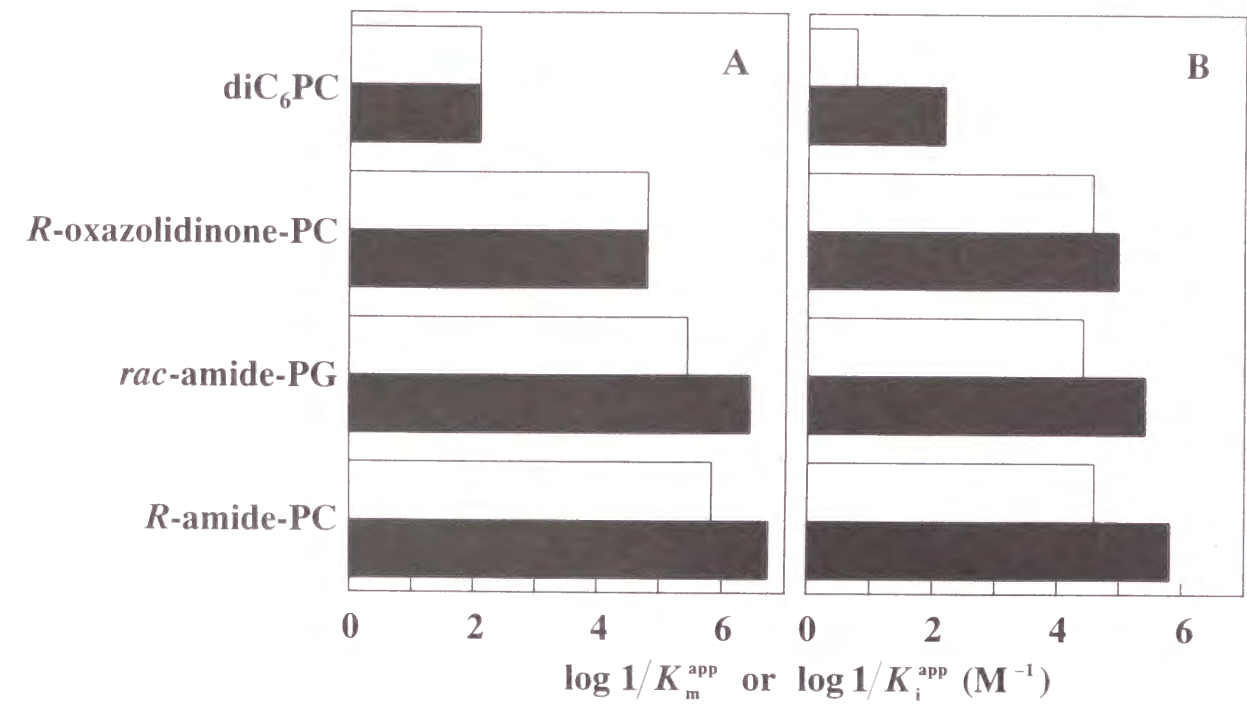


Fig. 1-2-11 Binding constants of monodispersed genuine substrate (diC₆PC), 1/*K_m^{app}*, and substrate analogs, (*R*-oxazolidinone-PC, *rac*-amide-PG, and *R*-amide-PC), 1/*K_i^{app}*, for *N. naja atra* (A: Group I) and *A. halys blomhoffii* (B: Group II) PLA₂s in the presence (solid bars) and absence (open bars) of Ca²⁺.

第六項 コリン含有基質アナログと PLA₂ との結合におよぼす His 48 のプロトン化の影響

Yu と Dennis は⁵³⁾, コブラ (*N. naja naja*) 毒由来 PLA₂ とアミド型基質アナログとの結合力が、触媒基 His 48 のプロトン化により著しく減少することを示した。一方、手島らは²²⁾, コブラ (*N. naja atra*) 毒由来 PLA₂ と単分子分散状 diC₆PC との結合は pH に依存しないことを示した。この違いは、アミド型基質アナログのアミドプロトンが His 48 と水素結合することによると考えられた。

そこで、飽和量の Ca²⁺ 存在下、His 48 がほぼプロトン化または脱プロトン化しているそれぞれの pH 6.8 と 8.2 において、コブラ毒 (*N. naja atra*) 由来 PLA₂ と *R*-amide-PC および *R*-oxazolidinone-PC との結合定数を調べた (酵素-Ca²⁺ 複合体における His 48 の p*K* 値は

Table 1-2-3 Binding constants of genuine substrate (diC₆PC), 1/*K_m^{app}*, and those of the substrate analogs (*R*-amide-PC and *R*-oxazolidinone-PC), 1/*K_i^{app}*, for *N. naja atra* PLA₂ at pH 6.8 and 8.2.

pH	1/ <i>K_m^{app}</i> (M ⁻¹)	1/ <i>K_i^{app}</i> × 10 ⁻⁴ (M ⁻¹)	
	diC ₆ PC	<i>R</i> -amide-PC	<i>R</i> -oxazolidinone-PC
6.8	121.6 ± 5.2	146.4 ± 17.5	5.8 ± 0.4
8.2	127.9 ± 7.7	509.2 ± 40.6	6.2 ± 0.6

7.25 である^{21, 22, 27)} (Table 1-2-3). その結果, PLA₂ と *R*-amide-PC との結合力は His 48 がプロトン化することにより著しく低下するが, *R*-oxazolidinone-PC との結合力は真の基質と同様, どちらの pH においても同程度であり, His 48 のイオン化状態には依存しないことがわかった.

第七項 考察

1. PLA₂ と基質との結合におよぼす Ca²⁺ の影響

Fig. 1-2-4 に示したように, I 型 PLA₂ でありながら 69 位のアミノ酸残基が Lys であるウミヘビ毒由来 PLA₂ と真の基質との結合は, 69 位が Tyr である他の I 型 PLA₂ と同様に Ca²⁺ の存在に影響されなかった. X 線結晶解析の結果からも明らかなように¹⁵⁾, Ca²⁺ や基質との結合に関与するとされるアミノ酸残基はほぼ保存されており, I 型と II 型 PLA₂ で明確な置換が見られるのは, 69 位のアミノ酸残基のみである⁴⁸⁾. したがって, 今回の結果から考えると, I 型および II 型 PLA₂ における基質結合の Ca²⁺ 依存性の違いは, Ca²⁺ 結合部位や基質結合部位のアミノ酸残基の違いでは説明できないことになる.

2. PLA₂ と基質アナログとの結合におよぼす Ca²⁺ の影響

Fig. 1-2-7 に示したように, *rac*-amide-PG と I 型および II 型 PLA₂ との結合は, 真の基質の場合と異なり, すべて Ca²⁺ 依存性であった. プタ臍臓由来 PLA₂ (I 型) の変異体とアミド型基質アナログとの複合体の X 線結晶解析⁴⁷⁾, ヒト髄液由来 PLA₂ (II 型) と遷移状態アナログ (*L*-1-*O*-octyl-2-heptylphosphonyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine) との複合体の X 線結晶解析⁵⁴⁾, *N. naja naja* およびウシ臍臓由来 PLA₂ とアミド型基質アナログとの複合体の NMR 解析⁵⁵⁻⁵⁷⁾ によると, PLA₂ に結合した Ca²⁺ は基質アナログのリン酸基および 2 位のカルボニル基に配位しているという. 今回の *rac*-amide-PG を用いた結果は, これらの知見とよく一致する.

Verheij らによる PLA₂ の触媒機構の仮説では³⁵⁾, PLA₂ 分子内の触媒基 His 48 の N-1 原子から 3Å 離れたところにある水分子が, PLA₂ と結合した基質分子のカルボニル炭素を求核攻撃すると考えられている (Fig. 1-1-2). 一方, amide-PG と PLA₂ の複合体の X 線結晶解析によると⁴⁷⁾, His 48 のイミダゾール環は基質アナログ分子と直接水素結合するので, 求核攻撃しようとする水分子の入り込む空間はないという (Fig. 1-2-1). Fig. 1-2-7 に示したように, I 型 PLA₂ の真の基質 (diC₆PC) とアミド型基質アナログ (amide-PG) との結合の Ca²⁺ 依存性に違いが見られたのは, このような基質の結合様式と基質アナログの結合様式との間に違いがあるためと推測される.

そこで, amide-PG 分子内において真の基質と異なる構造をもつ部分に注目し, グリコール基をコリンに置換した *R*-amide-PC と, 環状構造を作ることによりアミドプロトン無くした *R*-oxazolidinone-PC を用いて実験を行った. その結果, Fig. 1-2-11 に示したように, アミド基をもち, 極性部分としてグリコール基またはコリン基をもつ *rac*-amide-PG または *R*-amide-PC と I 型 PLA₂ との結合は Ca²⁺ に依存するが, コリン基をもつアミド基を

もたない diC₆PC および *R*-oxazolidinone-PC と I 型 PLA₂ との結合は, Ca²⁺ に依存しなかった. したがって, この違いはアナログ分子内の NH 基と His 48 の N-1 原子との水素結合の形成によると考えられた.

そこで, His 48 と基質アナログ間の水素結合形成の有無を調べるために, His 48 がプロトン化および脱プロトン化する pH において, コブラ毒 PLA₂ (I 型) と基質アナログの結合定数を決定した. その結果, Table 1-2-3 に示したように, *R*-amide-PC の結合定数は酸性 pH における値の方が中性 pH の値よりも有意に小さかったが, *R*-oxazolidinone と真の基質の結合定数は pH に依存せず一定であることがわかった. この結果から, *R*-amide-PC は His 48 と水素結合を形成するが, *R*-oxazolidinone-PC や真の基質は His 48 と水素結合しないことが示唆された (Fig. 1-2-12).

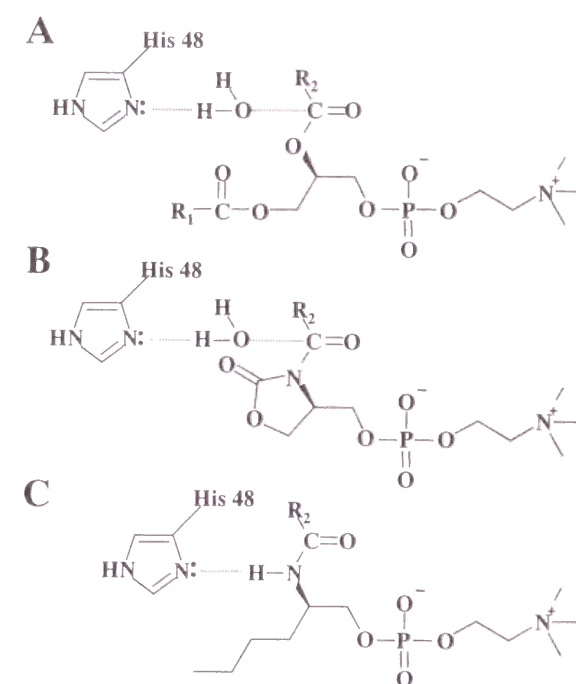


Fig. 1-2-12 Assumed binding modes of PLA₂ molecule with a genuine substrate diC₆PC (A) and its substrate analogs, *R*-oxazolidinone-PC (B) and *R*-amide-PC (C).

今回の実験において, 真の基質と I 型 PLA₂ との結合が Ca²⁺ の存在により影響されず, II 型 PLA₂ との結合力が Ca²⁺ によって増大するのは, Ca²⁺ 結合部位や基質結合部位に存在するアミノ酸残基の相違のためではないことが明らかになった. 他方, 真の基質と同様に His 48 と水素結合できない oxazolidinone-PC と I 型および II 型 PLA₂ との結合におよぼす Ca²⁺ の影響は真の基質の結合の場合と同じ傾向を示したが, His 48 と水素結合できる amide-PC と両型の PLA₂ との結合力はともに Ca²⁺ によって増大した. これらの結果から, I 型 PLA₂ と II 型 PLA₂ の間には, 触媒部位近傍の微視的なコンホメーションの違いが存在するが, His 48 と水素結合できる amide-PC のような基質アナログが結合するに伴って, 両者は同一化することが示唆された (Fig. 1-2-13).

第三節 マノアライドアナログによるホスホリパーゼ A₂ 活性の阻害機構

－PLA₂の種類による阻害機構の多様性－

第一項 序

マノアライド（MLD）は海綿（*Luffariella variabilis*）から単離されるセスタテルペノイドである⁵⁸⁾。MLDは抗炎症作用や鎮痛作用を示すが⁵⁹⁾、これらの作用はPLA₂活性を阻害しアラキドン酸の産生を抑制することによると考えられている。すなわち、MLDは*in vitro*において、ハチ毒⁶⁰⁾、コブラ毒⁶¹⁾、およびウシ腓膵⁶²⁾由来のPLA₂を時間依存的かつ非可逆的に不活性化することが報告されている。MLDの構造は、シクロヘキセン環を含む比較的疎水性の炭素鎖とヘミアセタール環およびγ-ラクトン環の3つの部分から構成されており、水溶液中ではヘミアセタール環とγ-ラクトン環が開環して、2つのアルデヒド基が露出する（Fig. 1-3-1）。このようなMLDの構造や、MLDによるPLA₂の不活性化が外因性のLysの存在により保護されること⁶³⁾、および、不活性化されたPLA₂のアミノ酸組成分析の結果^{61, 64, 65)}から判断して、MLDによる不活性化の原因はPLA₂分子内のLys残基の化学修飾によると考えられている。

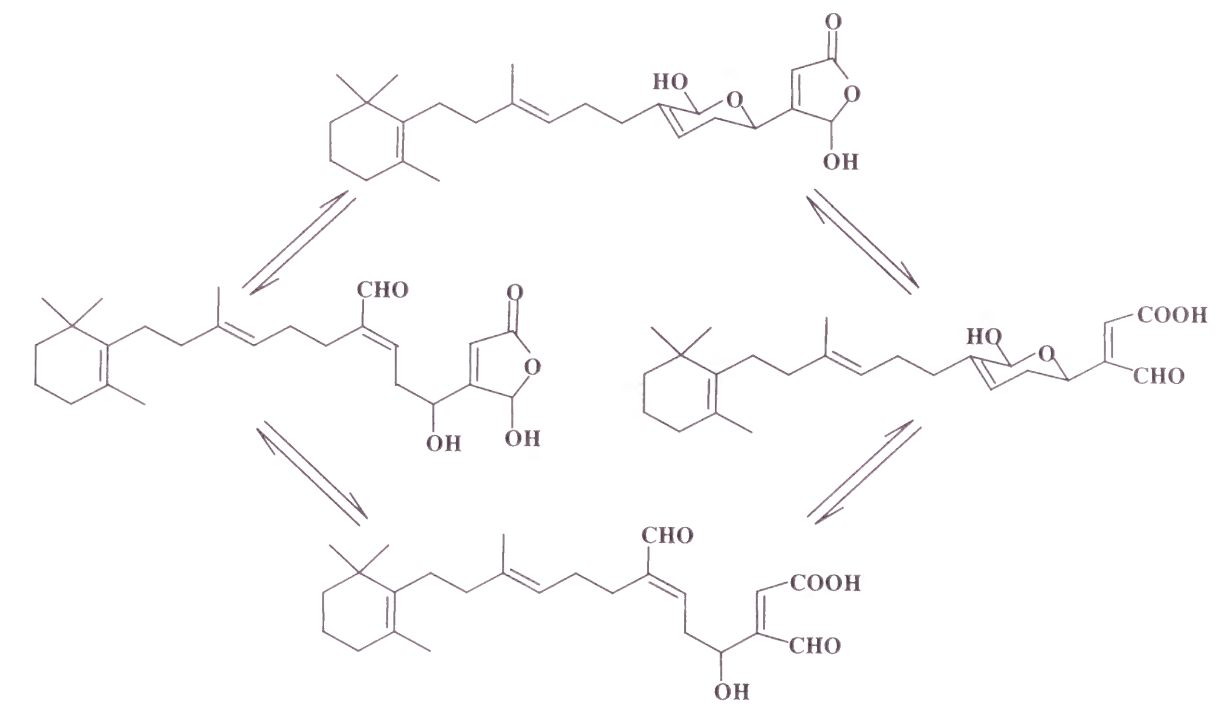


Fig. 1-3-1 Chemical structures of MLD in its closed and open forms.

細胞外に分泌され、分子量が約14kDaで、酵素活性にCa²⁺が必須であるI型とII型PLA₂はともに、基質が単分子分散状態のときは低い酵素活性しか示さないが、基質がミセルを形成すると酵素活性が急激に増大することが知られている（第一節 Fig. 1-1-11 参照）。

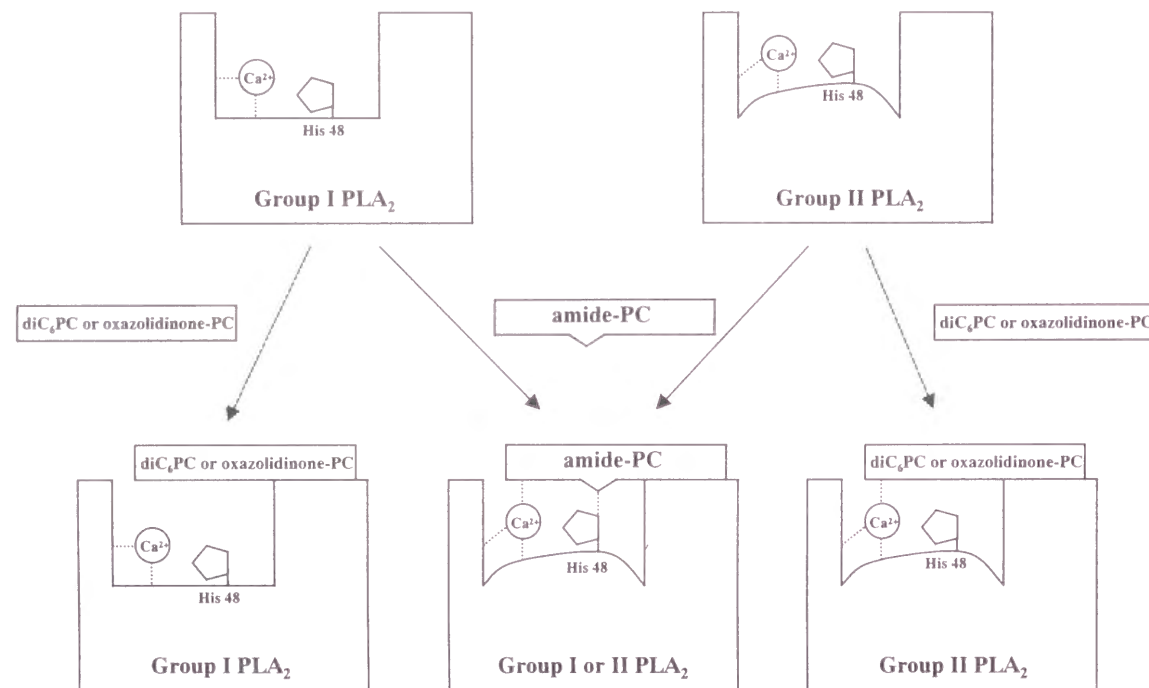


Fig. 1-2-13 Schematic representation of the difference in the microscopic conformation between group I and II PLA₂s, and the binding modes of these enzymes with the genuine substrate and substrate analogs.

この現象は、PLA₂ の分子内には基質の加水分解を触媒する部位（触媒部位）とは別に、ミセル界面を認識する界面認識部位が存在することで説明されている³⁵⁾。

以前、Lombardo と Dennis は⁶¹⁾、MLD が I 型に属するコブラ (*Naja naja naja*) 毒由来 PLA₂ による phosphatidylcholine の加水分解を阻害するが、phosphatidylethanolamine の加水分解は阻害しないことを示した。この結果は、PLA₂ が MLD により化学修飾されても、PLA₂ の触媒部位は完全に機能していること、すなわち、MLD による阻害が PLA₂ の触媒部位以外の部位の修飾によることを示唆している。また、Reynolds らは⁶⁶⁾、MLD の dehydroxy 体である manologue が *N. naja naja* PLA₂ に含まれる 4 つの Lys 残基のうちの 3 つを化学修飾し、その 1 つは Lys 6 であることを示した。さらに、Glaser らは⁶⁴⁾、ハチ毒由来 PLA₂ の MLD による不活性化が 3 つの Lys 残基のうちの Lys 94 の修飾によることを推定した。コブラ毒^{67,68)} やハチ毒⁶⁹⁾ 由来 PLA₂ の X 線結晶解析によれば、上記の Lys 6 と Lys 94 は界面認識部位に存在すると思われる。

我々の研究グループは、MLD に比べて単純な構造を持ち、化学的に安定な MLD アナログである 1-(2,5-dihydro-2-hydroxy-5-oxo-3-furanyl)-8,12-dimethyl-4-formyl-3,7,11-tridecatrienol (MLD-analog : Fig. 1-3-2) を合成し⁶²⁾、この化合物がウシ腓臓由来 PLA₂ に対して MLD と同程度の不活性化作用を有し、しかも修飾される Lys の平均残基数はそれほど多くないことを示した⁶⁵⁾。

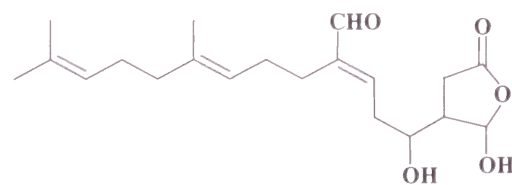


Fig. 1-3-2 Chemical structure of MLD-analog (1-(2,5-dihydro-2-hydroxy-5-oxo-3-furanyl)-8,12-dimethyl-4-formyl-3,7,11-tridecatrienol).

そこで、I 型に属するウシ腓臓、ブタ腓臓、コブラ (*N. naja atra*) 毒、およびウミヘビ (*P. australis*) 毒由来 PLA₂ と、II 型に属するマムシ (*A. halys blomhoffii*) 毒、ハブ (*T. flavoviridis*) 毒、クサリヘビ (*V. russelli russelli*) 毒由来 PLA₂ の MLD-analog による酵素活性の阻害を、物理化学的に存在状態の異なる基質を用いて測定するとともに、この不活性化反応に対するミセル状 *n*-dodecylphosphocholine (*n*-C₁₂PC) による保護作用を調べ、MLD-analog による不活性化機構の多様性を示した。また、これらの結果とアミノ酸組成分析の結果を比較して不活性化に関与する Lys 残基を推定するとともに、ウシ腓臓由来 PLA₂ については、修飾される Lys 残基の同定を行った。

第二項 MLD-analog による PLA₂ の不活性化

Fig. 1-3-3 は、MLD-analog による種々の PLA₂ の不活性化反応の経時変化を、中性界面活性剤である Triton X-100 と 1,2-dilauroyl-*sn*-glycerophosphocholine (diC₁₂PC) との混合ミ

セルを基質として追跡した結果を示す。ハブ毒とクサリヘビ毒 (II 型) 由来 PLA₂ の場合には強い不活性化が見られ、反応開始 90 分後には残存活性が 10% にまで低下した。また、ウミヘビ毒由来 PLA₂ (I 型) の活性は 90 分で 20% に低下した。一方、コブラ毒 (I 型) とマムシ毒 (II 型) 由来 PLA₂ の不活性化は比較的ゆるやかで、90 分でそれぞれ 60% と 40%

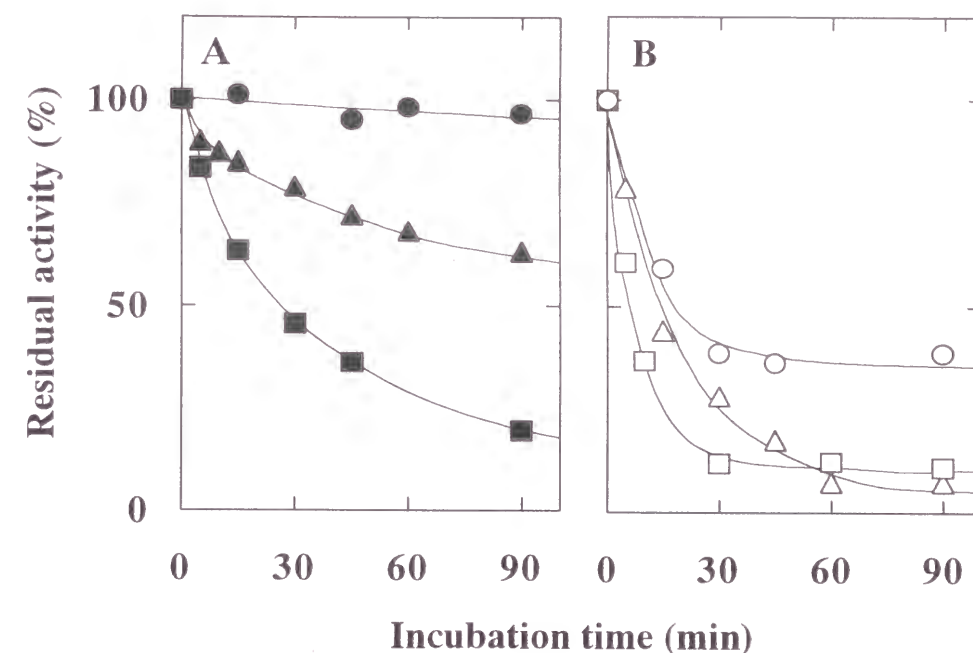


Fig. 1-3-3 Inactivation of PLA₂s toward nonionic mixed micellar substrate by MLD-analog. A, Group I PLA₂s: ●, Bovine; ▲, *N. naja atra*; ■, *P. australis*. B, Group II PLA₂s: ○, *A. halys blomhoffii*; △, *T. flavoviridis*; □, *V. russelli russelli*.

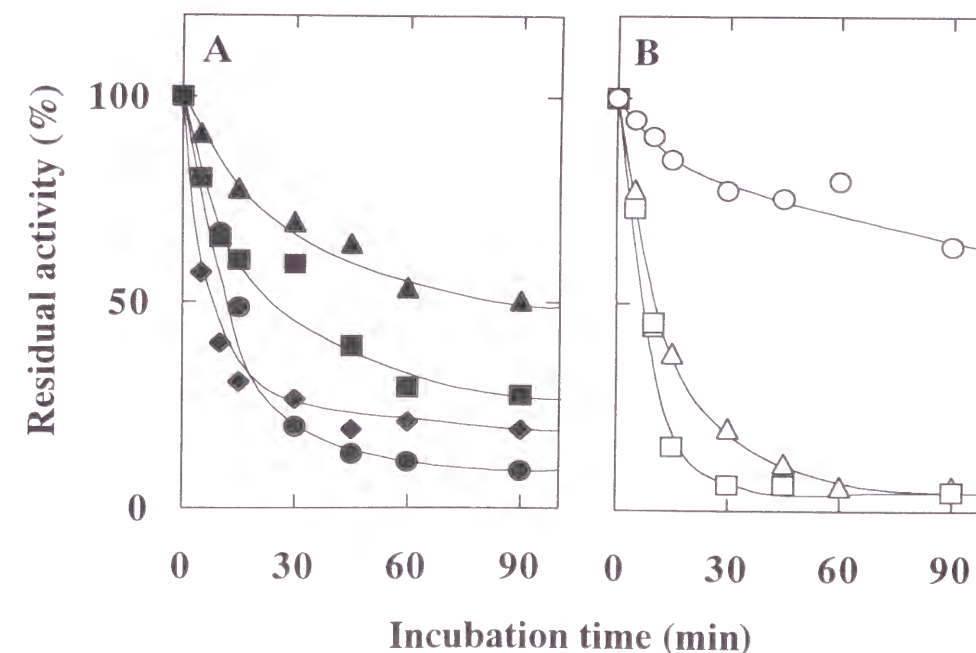


Fig. 1-3-4 Inactivation of PLA₂s toward anionic mixed micellar substrate by MLD-analog. A, Group I PLA₂s: ●, Bovine; ◆, porcine; ▲, *N. naja atra*; ■, *P. australis*. B, Group II PLA₂s: ○, *A. halys blomhoffii*; △, *T. flavoviridis*; □, *V. russelli russelli*.

に低下した。ウシ膵臓由来 PLA₂ (I 型) においては、この基質を用いて測定するかぎり不活性化はほとんど観測できなかった。

膵臓由来 PLA₂ の酵素活性はアニオン性界面活性剤の存在により著しく増大することが知られている⁷⁰⁾。そこでコール酸と diC₁₂PC の混合ミセルを基質として同様の実験を行った (Fig. 1-3-4)。ほとんどの PLA₂ においては非イオン性界面活性剤を含む基質溶液を用いた場合 (Fig. 1-3-3) と同様の結果になったが、ウシとブタ膵臓由来 PLA₂ では、ハブ毒やクサリヘビ毒由来 PLA₂ の場合と同程度の強い不活性化が見られた。

PLA₂ の活性は一般に、基質がミセルを形成すると急激に増大することが知られている³⁵⁾。そこで、単分子分散状 diC₆PC を基質として同様の実験を行った (Fig. 1-3-5)。すべての II 型 PLA₂ とウミヘビ毒由来 PLA₂ (I 型) においては、中性界面活性剤と diC₁₂PC の混合ミセルを基質とした場合 (Fig. 1-3-3) と同様の結果が得られたが、コブラ毒由来 PLA₂ とウシおよびブタ膵臓由来 PLA₂ (I 型) では、不活性化はほとんど検出されなかった。

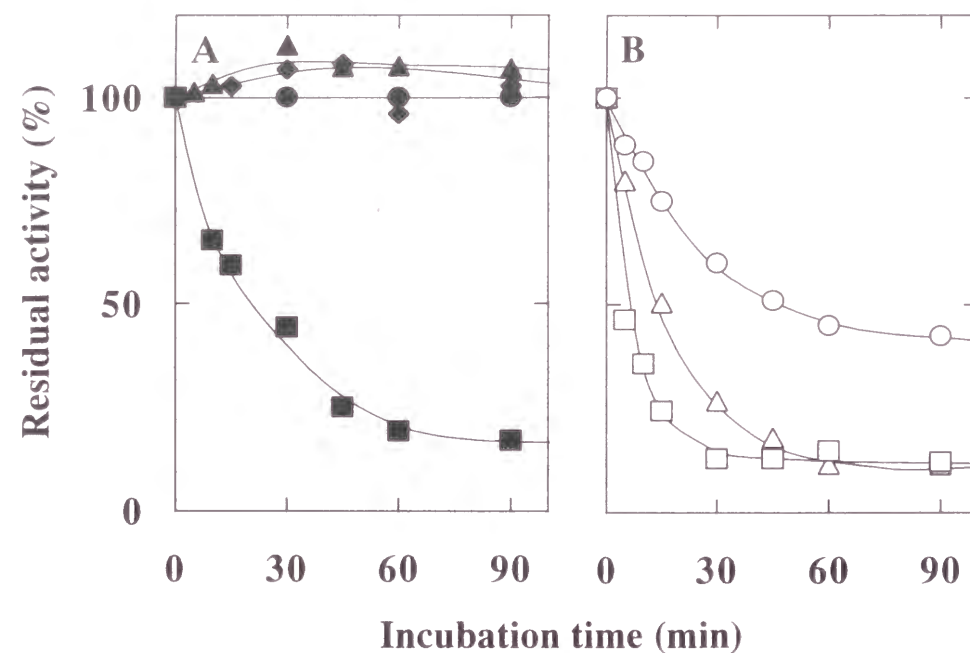


Fig. 1-3-5 Inactivation of PLA₂s toward monodispersed substrate by MLD-analog. A, Group I PLA₂s: ●, Bovine; ◆, porcine; ▲, *N. naja atra*; ■, *P. australis*. B, Group II PLA₂s: ○, *A. halys blomhoffii*; △, *T. flavoviridis*; □, *V. russelli russelli*.

第三項 MLD-analog による Lys 残基の化学修飾

1. MLD-analog による種々の PLA₂ の Lys 残基の修飾

MLD は PLA₂ 分子内の Lys 残基を不可逆的に修飾することで PLA₂ を不活性化すると考えられている^{61, 63-65)}。そこで、MLD-analog により化学修飾される Lys 残基の数をアミノ酸組成分析により決定した。

Fig. 1-3-6 は、diC₁₂PC とコール酸との混合ミセルを基質としたときの種々の PLA₂ の

残存活性を修飾された Lys の平均残基数に対してプロットした結果を示す。ウシ膵臓³³⁾、ブタ膵臓⁴¹⁾、マムシ毒⁷¹⁾、コブラ毒⁶⁷⁾、ウミヘビ毒⁴⁹⁾、ハブ毒⁷²⁾、およびクサリヘビ毒^{*)}由来 PLA₂ はそれぞれ、11, 9, 8, 5, 14, 10, および 11 個の Lys 残基を含むが、残存活性が 50% にまで低下するのに、それぞれ 1, 1, 3, 3.5, 4, 4, および 6 個の Lys 残基の化学修飾が必要であることがわかった。

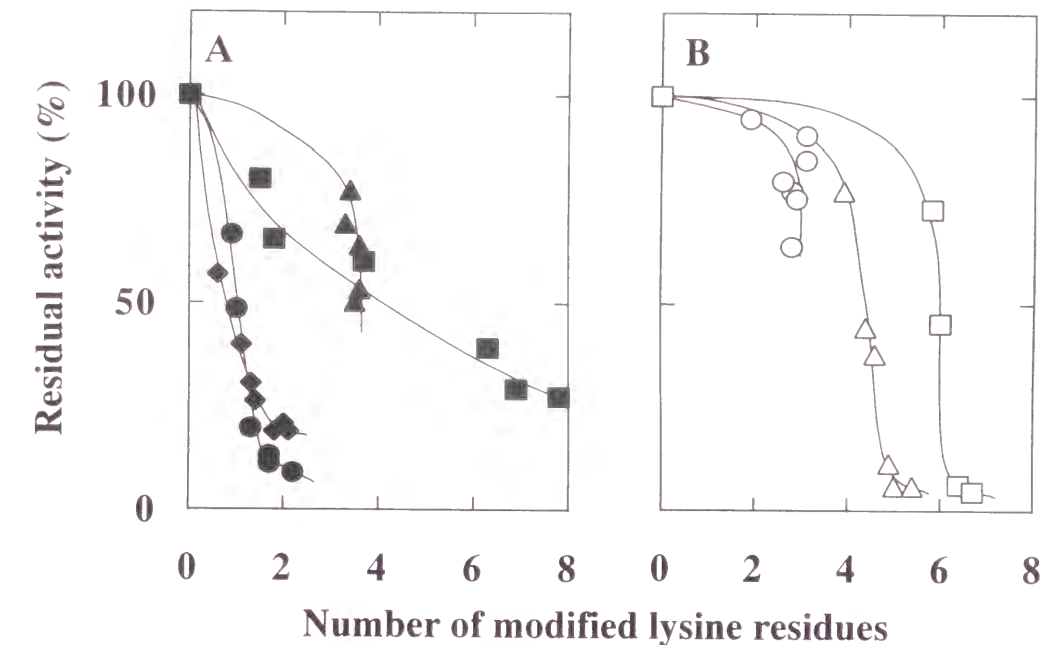


Fig. 1-3-6 Correlation between the residual activity and number of lysine residues of PLA₂s modified by MLD-analog. Residual activities of the MLD-modified PLA₂s toward mixed micelles of diC₁₂PC with cholic acid were plotted as a function of the number of modified lysine residues. A, Group I PLA₂s: ●, bovine pancreas; ◆, porcine; ▲, *N. naja atra*; ■, *P. australis*. B, Group II PLA₂s: ○, *A. halys blomhoffii*; △, *T. flavoviridis*; □, *V. russelli russelli*.

2. MLD-analog により化学修飾されるウシ膵臓由来 PLA₂ の Lys 残基の同定

Fig. 1-3-6 に示したように、MLD-analog がウシ膵臓由来 PLA₂ の Lys 残基を 1~2 分子修飾するだけで、その残存活性は 10% にまで低下した。そこで、修飾された Lys 残基を同定するため、修飾反応のスケールアップを行った。得られたサンプルは未修飾 PLA₂ を含んでいたため、Mono S カラムを用いて除去した。

Table 1-3-1 は未修飾酵素と、調製した修飾酵素のアミノ酸組成分析値の比較を示す。修飾により Lys 残基の数が約 1 個減少したが、他のアミノ酸残基の数は変化しなかった。

次に、未修飾酵素と修飾酵素を S-ピリジルエチル化後、リジルエンドペプチダーゼにより酵素消化し、得られたペプチドを逆相 HPLC で分離した (Fig. 1-3-7)。得られたペプチド断片 K-1, K-2, K-3, K-5, K-6, K-7, K-9, および K-10 をアミノ酸組成分析により同定したところ、それぞれは 1-10, 11-12, 13-53, 57-62, 63-108, 109-115, 119-122, および 123-126 の配列に相当するペプチドであることがわかった。しかし、配列 54-56 と 116-118 に相当する 2 つのペプチドは同定できなかった。次に、未修飾酵素と修飾酵素のクロマト

*) Inoue, S., *et al.*, unpublished data

グラムを比較したところ、修飾酵素の K-5 のピーク高が未修飾酵素よりも低くなり、保持時間 25 分のところに新たなピークが現れた。そこで、後者のピークのペプチドを気相式シークエンサーで分析した結果、それらは 58-62 に相当するアミノ酸配列（Leu-Asn-Ser-Cys-Lys），すなわちフラグメント K-5（57-62）のうち 57 位の Lys を欠いたものに相当することがわかった。

Table 1-3-1 Amino acid composition of unmodified and MLD-analog-modified bovine pancreatic PLA₂. Figures in parentheses are based on the amino acid sequence determined by Dijkstra *et al.* [Ref. 33].

Amino acid	Intact PLA ₂	Modified PLA ₂
Asp	26.1 (25)	25.8
Thr	4.1 (4)	4.0
Ser	9.9 (10)	9.7
Glu	8.6 (8)	8.5
Pro	5.3 (5)	5.2
Gly	6.6 (6)	6.5
Ala	6.4 (6)	6.3
Val	4.1 (4)	4.2
Met	1.0 (1)	1.0
Ile	4.6 (5)	4.6
Leu	8.2 (8)	8.2
Tyr	6.8 (7)	6.8
Phe	3.9 (4)	3.9
Lys	11.0 (11)	10.0
His	2.1 (2)	2.1
Arg	2.0 (2)	2.0
Cys ^a	— (14)	—
Trp ^a	— (1)	—

^a) Cys and Trp were not determined

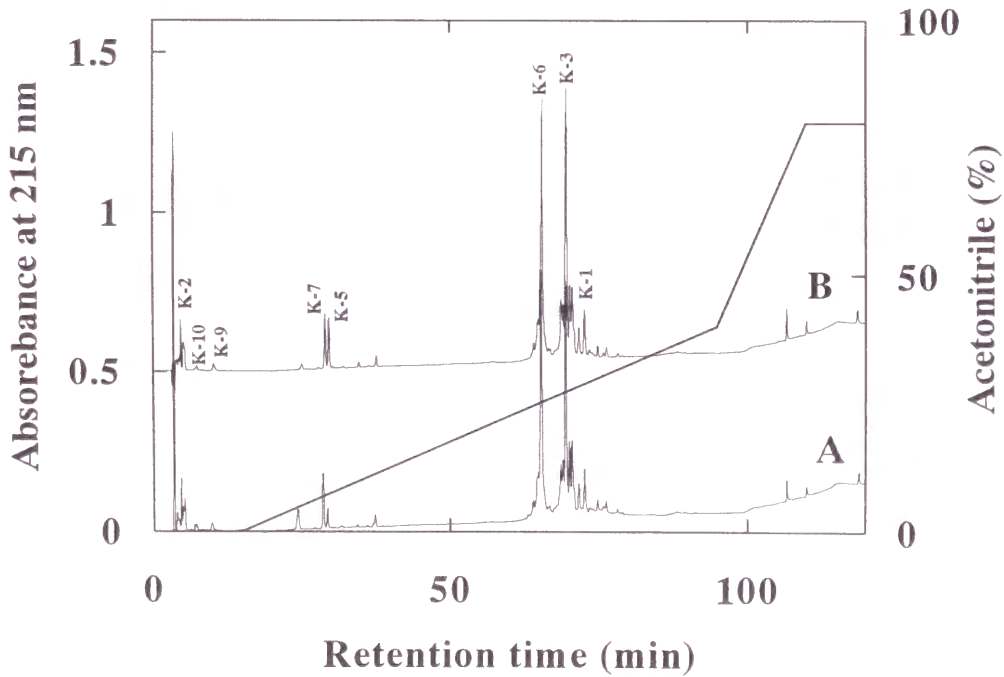


Fig. 1-3-7 Separation of the lysyl endopeptidase digests of MLD-analog-modified (A) and unmodified (B) bovine pancreatic PLA₂. The peptides were fractionated on a capcell pak C₁₈ column with a linear concentration gradient of acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid from 0 to 80%.

第四項 MLD-analog による修飾反応に対する *n*-C₁₂PC の保護作用

リゾレシチンのアナログである *n*-dodecylphosphocholine (*n*-C₁₂PC) は均一なミセルを形成することが知られている⁷³⁾。ミセル状 *n*-C₁₂PC は、PLA₂ の界面認識部位と結合するとともに^{24, 74-76)}、ウシ膵臓 PLA₂ との複合体構造の X 線結晶解析^{77, 78)} により示されたように、PLA₂ の触媒部位にも結合する。したがって、cmc 以上の濃度の *n*-C₁₂PC が存在する条件下で MLD-analog による PLA₂ の修飾反応を行った場合、酵素の界面認識部位と触媒部位は化学修飾から保護されることが予想される。

Table 1-3-2 は、MLD-analog による PLA₂ の不活性化の度合、修飾された Lys 残基数、およびそれらに対するミセル状 *n*-C₁₂PC による保護作用の要約を示す。PLA₂ の種類により違いはあるものの、ほとんどすべての PLA₂ において MLD-analog による不活性化と Lys 残基の修飾反応は *n*-C₁₂PC の存在により保護された。特に、ウミヘビ毒由来 PLA₂ を除く I 型 PLA₂ の不活性化作用はほぼ完全に保護されたが、マムシ毒由来 PLA₂ (II 型) では、顕著な保護作用は見られなかった。

Table 1-3-2 Effects of *n*-C₁₂PC on the inactivation and modification of PLA₂s by MLD-analogue.

Phospholipase A ₂ Incubation time (min)		Residual activity (%)						Number of modified Lys residues	
		Mixed micelles of diC ₁₂ PC with Triton X-100 (1:5)		Mixed micelles of diC ₁₂ PC with cholate (1:5)		Monodispersed diC ₆ PC			
		- n-C ₁₂ PC	+ n-C ₁₂ PC	- n-C ₁₂ PC	+ n-C ₁₂ PC	- n-C ₁₂ PC	+ n-C ₁₂ PC	- n-C ₁₂ PC	+ n-C ₁₂ PC
Group I									
Bovine pancreas	30	95.1	—	19.6	86.2	100.0	—	0.9	0.4
	90	96.6	—	8.9	77.2	100.0	—	1.8	1.0
Porcine pancreas	30	—	—	26.2	94.7	106.8	—	1.4	0.2
	90	—	—	18.9	93.3	102.7	—	2.1	0.5
<i>N. naja atra</i>	30	79.0	96.9	69.3	—	98.5	—	3.3	0.2
	90	63.2	92.6	50.3	—	107.0	—	3.6	0.4
<i>P. australis</i>	30	45.6	67.4	50.2	—	44.3	73.1	4.3	0.7
	90	19.4	50.6	27.3	—	17.1	40.0	7.1	2.1
Group II									
<i>T. flavoviridis</i>	30	28.3	60.0	20.0	—	26.8	64.4	4.6	1.0
	90	7.4	45.0	6.0	—	11.6	49.2	5.3	1.7
<i>V. russelli russelli</i>	30	11.9	65.0	6.2	—	13.0	73.4	6.4	1.5
	90	10.9	50.8	4.6	—	12.3	49.5	6.7	2.1
<i>A. halys blomhoffii</i>	30	38.9	67.1	77.4	—	60.0	55.9	1.9	0.9
	90	38.8	32.2	64.0	—	35.5	30.5	3.8	1.3

第五項 考察

Fig. 1-3-8 は I 型と II 型 PLA₂ の一次構造の比較を示す。今回の実験に用いた酵素のうち、ウシ膵臓、ブタ膵臓、コブラ毒、およびウミヘビ毒由来 PLA₂ は I 型に、ハブ毒、クサリヘビ毒、およびマムシ毒由来 PLA₂ は II 型に分類される。Fig. 1-3-3 ~ 1-3-5 に示したように、MLD-analog による不活性化反応の経時変化は、PLA₂ の種類や酵素活性の測定に用いた基質の物理化学的状態により変動する。MLD-analog は Lys 残基を修飾して PLA₂ を不活性化するが、これらの PLA₂ の間で Lys 残基の位置はあまり保存されていないので (Fig.

1-3-8), MLD-analog による PLA₂ の不活性化の多様性はそれぞれの酵素分子の表面における Lys 残基の分布の違いによると考えられる。

Group I	10	20	30	40	50	60
1. Bovine pancreas	ALWQFNGMIK	CKIPSSPELL	DFNNYGCYCG	LGGSGTPVDD	LDRCCQTHDN	CYKQAKKLD
2. Porcine pancreas	ALWQFRSMIK	CAIPGSHPLM	DFNNYGCYCG	LGGSGTPVDE	LDRCCETHDN	CYRDAKNLDS
3. <i>N. naja atra</i>	NLYQFKNMIQ	CTVP-SRSWW	DFADYGCYCG	RGGSGTPVDD	LDRCCQVHDN	CYNEAEKISG
4. <i>P. australis</i>	NLIQFGNMIQ	CANKGSRPSL	NYADYGCYCG	WGGSGTPVDE	LDRCCQVHDN	CYEQAGK-KG
Group II						
5. <i>T. flavoviridis</i>	GLWQFENMII	-KVVKKSGIL	SYSAYGCYCG	WGGRGKPKDA	TDRCCFVHDC	CYG---KVTG
6. <i>V. russelli russelli</i>	NLFQFAEMIV	-KMTGKNPLS	SYSDYGCYCG	WGGKGGKPKDA	TDRCCFVHDC	CY-E-GKKS-
7. <i>A. halys blomhoffii</i>	SLMQFETLIM	-KIAGRSIGW	YYGSYGCYCG	AGGQGRPKDA	SDRCCFVHDC	CYG---KVTG

	70	80	90	100	110	120	130
1.	CKVLVDNPLYT	NNYSYSCSNN	EITCSSENNA	CEAFICNCDR	NAAICFSKV-	P-YNKEHKNL	DKK-NC
2.	CKFLVDNPLYT	ESYSYSCSNT	EITCSNKNNA	CEAFICNCDR	NAAICFSKA-	P-YNKEHKNL	DTKKYC
3.	C-W----PYF	KTYSYECSQG	TLTCKGGNNA	CAAAVCDCCR	LAAICFAGA-	P-YNDNDYNI	NLKARC
4.	C-F----PKL	TLYSWKCTGN	VPTCNSK-TG	CKSFVCACDA	AAAKCFAKA-	P-YKKENYNI	DTKKRCK

5.	C-----NPKL	GKYTYSWNNG	DIVC-EGDGP	CKE-VCECDR	AAAICFRDNL	DTYDRNKYWR	YPASNCQEDS	EPC
6.	CK-----PKL	SLYSYSFQNG	GIVC-GDHNS	CKRAVCECDR	VAATCFRDNL	NTYD-KKYHN	YPPSQCTGT-	EQC
7.	C-----D-PKL	DVYTTYTEENG	AIVC-GGDDP	CKKQICECDK	DAAICFRDNI	DTYD-NKYWF	FPAKNCQEES	EPC

Fig. 1-3-8 Comparison of the amino acid sequences of seven PLA₂s. Sequence data are compared for bovine pancreas [Ref. 33], porcine pancreas [Ref. 41], *N. naja atra* [Ref. 67], and *P. australis* [Ref. 49] PLA₂s, which belong to Group I, and *T. flavoviridis* [Ref. 72], *V. russelli russelli* [Inoue *et al.*, unpublished data], and *A. halys blomhoffii* [Ref. 71] enzymes, which belong to Group II. Gaps (-) were introduced for maximal alignment of cysteine and maximal homology. The stippled boxes indicate Lys residues.

1. MLD-analog による膵臓およびコブラ毒由来 PLA₂ (I 型) の不活性化

Fig. 1-3-4 に示したように、アニオン性混合ミセル状基質を用いた場合、PLA₂ の種類により差はあるものの、MLD-analog で修飾されたすべての PLA₂ の酵素活性は低下した。しかし、単分子分散状基質を用いた場合には、I 型に属する膵臓およびコブラ毒由来 PLA₂ では有意な活性低下は見られなかった (Fig. 1-3-5)。また、Table 1-3-2 に示したように、これらの酵素の不活性化は、修飾反応時にミセル状 *n*-C₁₂PC が存在するとほぼ完全に保護された。以上の結果から判断すると、MLD-analog による膵臓およびコブラ毒由来 PLA₂ の不活性化は、酵素の界面認識部位に存在する Lys 残基が修飾されて起ったと考えられる。

以前、Lombardo と Dennis は⁶¹⁾、I 型に属するコブラ (*N. naja naja*) 毒由来 PLA₂ による phosphatidylcholine の加水分解は MLD により阻害されるが、phosphatidylethanolamine の加水分解は阻害されないことを示した。この結果は、MLD により化学修飾されたにもかかわらず、本酵素の触媒部位は完全に機能していること、すなわち、触媒部位は MLD により修飾されないことを示す。さらに、Roynolds らは⁶⁰⁾、MLD によりコブラ毒 (*N. naja naja*) 由来 PLA₂ の 3 ヶ所の Lys 残基が修飾されるが、そのうちのひとつは、6 位の Lys であることを示した。この残基は N 末端の α ヘリックスに含まれており、界面認識への関与が示唆されている。

2. MLD-analog により修飾されるウシ膵臓由来 PLA₂ の Lys 残基の決定

Fig. 1-3-7 に示したように、MLD-analog により修飾された酵素をリジルエンドペプチ

ダーゼ消化し、得られたペプチドの HPLC パターンを未修飾酵素のものと比較したところ、K-5 のピークの高さが低下し、保持時間約 25 分のところに新たなピークが現れた。このピークに含まれるペプチドの一次構造を決定したところ、それは 58 から 62 位までのペプチド、すなわち、K-5 フラグメント (57 位から 62 位) の 57 位の Lys 残基を欠くものであった。リジルエンドペプチダーゼは一般に、X-Lys-Lys-Y のように連続する 2 つの Lys を含むペプチドでは、Lys-Y の間よりも 2 つの Lys 残基の間を優先的に切断する。ウシ膵臓由来酵素ではこの種の Lys 残基は 56 位と 57 位にあり、未修飾の酵素では Lys 56 の C 末端が切断されたことになる。他方、修飾酵素では、Lys 57 の C 末端が切断されたペプチドが検出されたので、MLD-analog は Lys 56 を修飾したと考えられた。

Noel らは⁷⁹⁾、ウシ膵臓由来 PLA₂ について部位特異的置換を行い、Lys 56 を中性もしくは疎水性アミノ酸に置換した。さらに、Lys 56 を Met に置換した酵素については X 線結晶解析を行った。Lys 56 の置換によりアニオン性ミセル状の phosphatidylglycerol に対する活性は低下したが、非イオン性ミセル状の phosphatidylcholine に対する活性は逆に増大した。また、結晶解析から、この置換により 56 位近傍のループ構造が変化することがわかった。

Fig. 1-3-3 と Fig. 1-3-4 に示したように、MLD-analog との反応により、ウシ膵臓由来 PLA₂ の酵素活性はアニオン性ミセル状基質に対しては低下したが、非イオン性ミセル状基質に対しては変化しなかった。アニオン性ミセル状基質に対する酵素活性の低下が Lys 56 の修飾により生じたのであれば、そのことは Noel らの結果⁷⁹⁾ と矛盾しないが、非イオン性ミセル状基質に対する結果は矛盾する。これは、Lys 56 と反応した MLD-analog の非常に大きな疎水性付加物が酵素の活性化を妨げるためではないかと考えられる。

Table 1-3-1 から明らかのように、MLD-analog により修飾されたウシ膵臓由来 PLA₂ の Lys 残基数は平均 1 個である。しかし、Fig. 1-3-7 に示したペプチド断片の HPLC パターンからわかるように、修飾酵素においても K-5 のピークは完全には消失しない。このことは、MLD-analog がウシ膵臓由来 PLA₂ の Lys 56 以外の Lys 残基をも修飾していることを示唆する。その修飾部位は今回の実験では確認できなかったが、HPLC の溶出パターンのピーク面積から判断すると、修飾された Lys 残基の約 2/3 が Lys 56 であるので、PLA₂ の不活性化の原因は主に Lys 56 の修飾によると考えられる。これまで、Lys 56 が界面認識部位に含まれるかどうかはあまり明確でなかったが、今回の結果により明確になった。

3. MLD-analog によるウミヘビ毒 (I 型) および II 型由来 PLA₂ の不活性化

Fig. 1-3-3 ～ 1-3-5 に示したように、MLD-analog により修飾されたウミヘビ毒由来 PLA₂ (I 型) と II 型 PLA₂ の酵素活性は、ミセル状基質だけでなく、単分子分散状基質に対しても著しく低下した。Table 1-3-2 に示したように、ウミヘビ毒、ハブ毒、およびクサリヘビ毒 PLA₂ は、修飾反応液にミセル状 *n*-C₁₂PC を添加しても完全には保護されなかった。すなわち、これら 3 種類の酵素の残存活性は修飾反応開始後 90 分で約 10 から 20% に低下したが、ミセル状 *n*-C₁₂PC を存在させておくことにより 40 から 50% の残存活性にとどまった。一方、マムシ毒由来 PLA₂ においては、*n*-C₁₂PC による保護作用はほとんど見られなかった。

以前、コブラ毒⁷⁵⁾、ハブ毒²⁴⁾、およびマムシ毒⁷⁴⁾ 由来 PLA₂ とミセル状 *n*-hexadecyl-

phosphorylcholine (*n*-C₁₆PC) との結合定数が調べられたが、それらの値は同程度であった。したがって、ミセル状 *n*-C₁₂PC による修飾保護作用の違いは、これらの酵素に対する *n*-C₁₂PC の親和性の違いによるのではなく、MLD-analog により修飾される Lys 残基の位置と数の違いによるものと考えられる。

4. MLD-analog により修飾されるウミヘビ毒 (I 型) および II 型 PLA₂ の Lys 残基の予測

Fig. 1-3-9 はブタ膵臓由来 PLA₂ と amide-PC の複合体構造を示す。図中には、今回の実験で MLD-analog により修飾されることがわかった、または修飾されると推測される Lys 残基の位置が示されている。これまでに、いくつかの PLA₂ と基質アナログとの複合体構造が X 線結晶解析により明らかにされ^{47, 54, 67)}、Tyr 69 の水酸基は基質アナログ分子のリン酸基の酸素原子の 1 つと水素結合することが示されている (第 2 節参照: Fig. 1-2-1)。Fig. 1-3-8 に示したように、ウミヘビ毒由来 PLA₂ を除く I 型 PLA₂ は 69 位に Tyr 残基をもち、単分子分散状基質に対しては MLD-analog による有意な不活性化作用は見られなかった。一方、II 型に属する PLA₂ とウミヘビ毒由来 PLA₂ は 69 位に Lys 残基をもち、単分子分散状基質に対しても不活性化が見られた。このことから、ウミヘビ毒、ハブ毒、およびクサリヘビ毒由来 PLA₂ の MLD-analog による不活性化には Lys 69 の修飾が関与すると推測される。

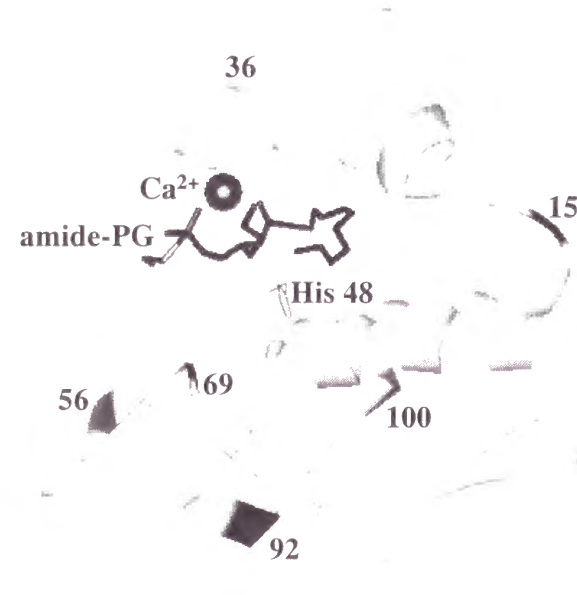


Fig. 1-3-9 Three-dimensional structure of PLA₂ interacted with the amide-PG and Ca²⁺. Position of the Lys residues possibly modified by MLD-analog were indicate.

さらに、これら 3 種類の酵素の不活性化がミセル状 *n*-C₁₂PC の存在により完全には保護されないことから判断すると、触媒や界面認識部位以外の場所に存在する Lys 残基の修飾によっても不活性化が起こることが考えられる。

一次構造の比較から推定すると、これら 3 つの酵素の修飾される Lys 残基は、N 末端の α ヘリックスの終末 (15 位付近)、Ca²⁺ 結合部位 (36 位) (ウミヘビ毒由来 PLA₂ はこの位置に Lys 残基をもたない)、および 92 位 (この位置の Lys 残基はこれら 3 種類の酵素で保存されている) に存在する残基ではないかと考えられる。これらの位置は一般に、触媒部位や界面認識部位にあるとは考えられていないので、これらの位置の Lys 残基の修飾は、立体構造の変化を介して酵素活性の低下に寄与していることが予想される。一方、マムシ毒由来 PLA₂ の不活性化は、ミセル状 *n*-C₁₂PC の存在によりほとんど保護されなかったので、この不活性化作用は、触媒部位や界面認識部位以外の場所に存在する Lys 残基の修飾によるものと考えられた。したがって、Lys 100 または Lys 92 の修飾が原因ではないかと予想した。というのは、Lys 100 は界面認識部位の反対側に位置するが、触媒部位の水素結合網に含まれる Asp 99 の隣に位置しており、Lys 92 は II 型酵素とウミヘビ毒由来酵素で保存されているからである。

要約すると次のようになる。 1) PLA₂ の Lys 残基は一般に酵素分子の表面に存在しているので、MLD-analog により複数の Lys 残基が修飾される。 2) ウシ膵臓由来 PLA₂ の Lys 56 は MLD-analog により比較的特異的に修飾される。 3) MLD-analog による Lys 残基への付加物は、構造的に大きな疎水性部分のために、単分子分散状基質やミセル状基質の結合を妨げたり、酵素のコンフォメーション変化を引き起こすことにより酵素を不活性化させる。

スフィンゴミエリナーゼの触媒機構の解明

第二章

スフィンゴミエリナーゼの触媒機構の解明

第一節 *Bacillus cereus* 菌由来スフィンゴミエリナーゼの Mg^{2+} 結合と触媒機能

第一項 序

スフィンゴミエリナーゼ (SMase) [EC 3.1.4.12] はスフィンゴミエリン (SM) からセラミド (Cer) とホスホコリンを産生する酵素であり, SM に対してホスホリパーゼ C 様の加水分解反応を触媒する⁸⁰⁾. 現在, SMase は哺乳類に 5 種類, バクテリアに 1 種類の分子種の存在が確認されており, 加水分解反応の至適 pH と金属要求性に基づいて分類されている (Table 2-1-1)^{10, 81)}. これまでの研究から, 哺乳類由来の酸性 SMase (A-SMase) と中性 Mg^{2+} 依存性 SMase (N-SMase) は, セラミドの細胞内レベルを調節し, それにより引き起こされる種々の応答を制御していることが知られている⁹⁻¹¹⁾.

Table 2-1-1 Classification of SMases [Refs. 10 and 81].

	Location	Size (kDa)	Cation requirement	pH optimum
Mammalian				
A-SMase	Lysosome	70	—	5.0
Zn^{2+} -SMase	Secreted	—	Zn^{2+}	5.0
N-SMase	Plasma membrane	47, 92	Mg^{2+}	7.4
Cytosolic N-SMase	Cytosol	45, 95	—	7.4
Alkaline SMase	Intestine	85	—	9.0
Bacteria (<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , and <i>L. interrogans</i>)				
SMase	Secreted	34	Mg^{2+}	~7

バクテリア由来の SMase は古くから赤血球の溶血を引き起こす菌体外毒素として知られている⁸⁰⁾. *Bacillus cereus* 菌由来 SMase は分子量 34 kDa の酵素で, 触媒活性に Mg^{2+} を必須とし, Ca^{2+} や Mn^{2+} の存在により赤血球膜への吸着力が増大する⁸⁰⁾. また, アミノ酸残基の化学修飾実験から⁸²⁾, 触媒活性や赤血球膜への吸着には, 酸性アミノ酸残基と分子内に 2 つしか存在しない Cys 残基の関与が示唆され, 部位特異的変異の実験から^{83, 84)}, Asp 126 と Asp 156 が基質認識に関与するとともに, Asp 295, His 151, および His 296 が加水分解反応に非常に重要であることが報告されている.

SMase の三次元構造は未だ決定されていないが, 松尾らは⁸⁵⁾, 3D1D 適合法により *B. cereus* 菌由来 SMase とウシ脾臓由来 DNase I のアミノ酸配列に相同性があることを示し, DNase I の三次元構造を基にした protein fold recognition 法により, SMase の立体構造を推定した. DNase I はリン酸エステル結合の加水分解を触媒する酵素という点では SMase と同じであり, DNase I の基質結合や触媒作用に関与すると考えられているアミノ酸残基は, SMase においても保存されている.

最近, 哺乳類由来の中性 Mg^{2+} 依存性 SMase をコードする遺伝子がクローニングされ⁸⁶⁾, その結果から推定されるアミノ酸配列は *B. cereus* 菌由来 SMase との相同性はそれほど高くないものの, 基質結合や触媒作用に関与すると考えられるアミノ酸残基は保存されていることがわかり, 両酵素の触媒機構は類似することが予想された.

本研究では、*B. cereus* 菌由来 SMase の触媒機構を解明するため、必須金属である Mg^{2+} について、SMase に対する結合様式、構造安定性への寄与、および酵素活性への関与の仕方を明らかにするとともに、真の基質である sphingomyeline (SM) と Triton X-100 との混合ミセルおよび、水溶性合成基質であるミセル状 2-hexadecanoylamino-4-nitrophenyl-phosphocholine (HNP) を基質とする酵素反応パラメーターの pH 依存性を調べることで、基質結合と触媒活性に関与するアミノ酸残基のイオン化状態を明らかにしようとした。

Fig. 2-1-1 は、実験に用いた基質の構造を示す。

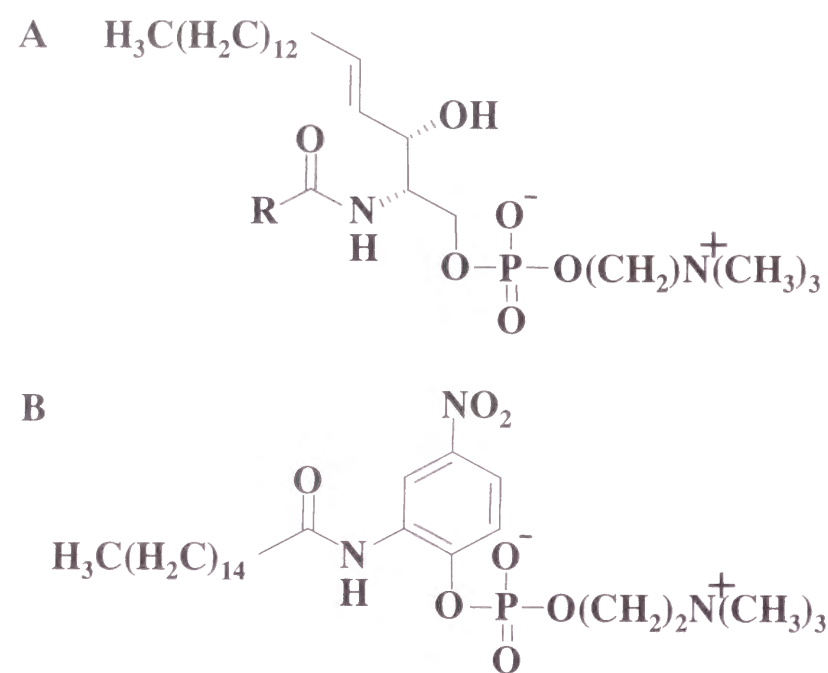


Fig. 2-1-1 Chemical structures of two substrates which could be hydrolyzed by SMase. A : sphingomyeline (SM). B : 2-hexadecanoylamino-4-nitrophenylphosphocholine (HNP)

第二項 Mg^{2+} の結合様式

B. cereus 菌由来 SMase は活性発現に Mg^{2+} を必須とするので⁸⁰⁾ Mg^{2+} 結合について詳しく調べた。

Fig. 2-1-2 は、 Mg^{2+} 存在下もしくは非存在下における *B. cereus* 菌由来 SMase の Trp 残基に由来する蛍光スペクトルを示す。SMase の 340 nm における最大蛍光強度は Mg^{2+} の結合により、わずかではあるが低下した。

そこで、 Mg^{2+} の添加による蛍光強度の低下 ($|\Delta F|$) とミセル状 HNP を基質としたときの加水分解反応の初速度 (v) を Mg^{2+} 濃度 (C_M) の対数に対してプロットした (Fig 2-1-2)。その結果、 $|\Delta F|$ の Mg^{2+} 依存性曲線には 2 つの転移がみられたことから、SMase には少なくとも親和性の異なる 2 つの Mg^{2+} 結合部位が存在することが明らかになった。また、 v の Mg^{2+} 依存性曲線から、低親和性部位に対する Mg^{2+} の結合が酵素活性に必須であることが確認された。

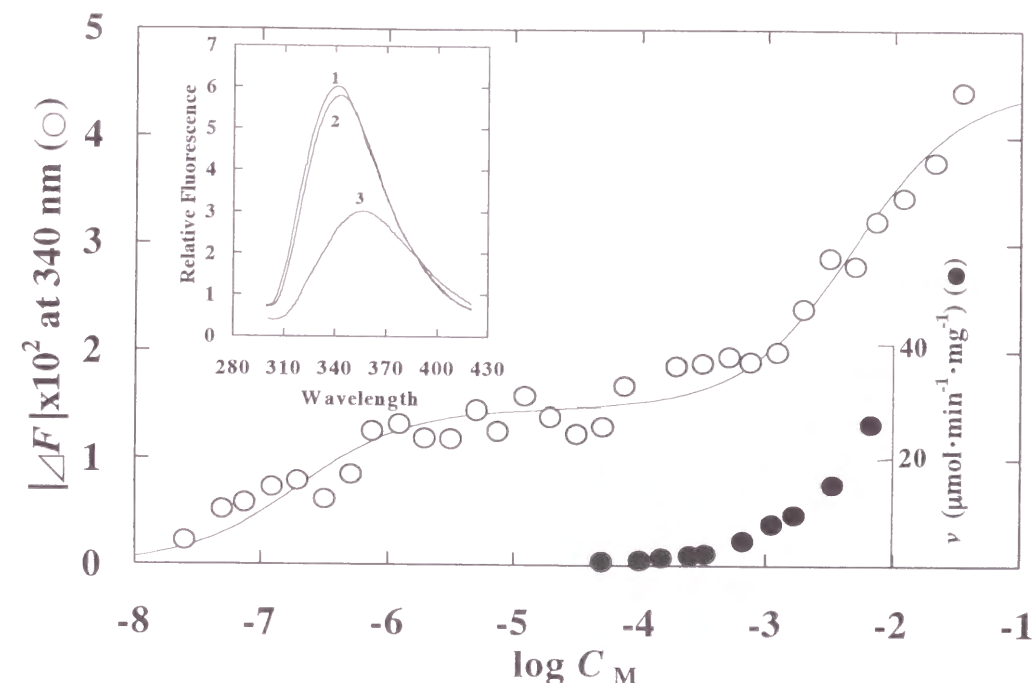
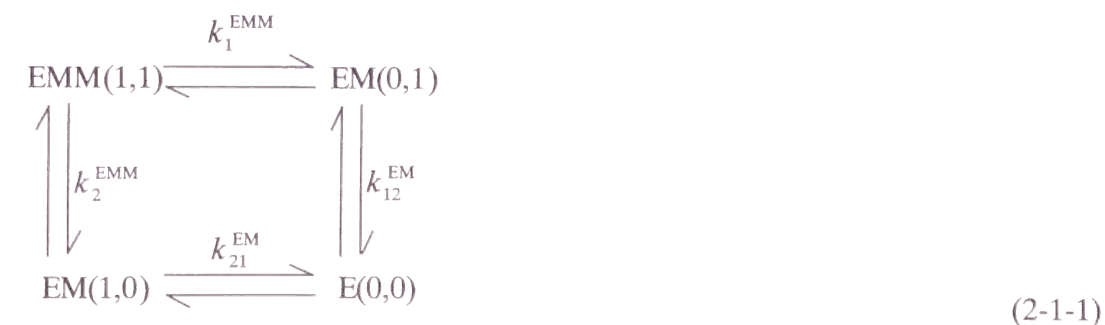


Fig. 2-1-2 Fluorescence change at 340nm, with excitation at 290 nm, of *B. cereus* SMase, $|\Delta F|$ (○), on the addition of Mg^{2+} , plotted as a function of the logarithm of the total concentration of Mg^{2+} , C_M . This figure also shows the change in the initial velocity of the hydrolysis of HNP, v (●). The inset shows the fluorescence spectra of SMase with excitation at 290 nm. 1, apoenzyme; 2, Mg^{2+} -complex; 3, *N*-acetyl-*L*-tryptophanamide at the same molar concentration as the tryptophan in the enzyme molecule.

次に、親和性の異なる 2 つの部位に対する Mg^{2+} の結合定数を求めるために、次のスキームを仮定した。



ここで、E と M はそれぞれ SMase と Mg^{2+} を示し、EM と EMM はそれぞれ SMase と 1 分子の Mg^{2+} および 2 分子の Mg^{2+} との複合体を示す。括弧内の数字は 2 つの Mg^{2+} 結合部位を表し、1 と 0 はそれぞれ、 Mg^{2+} が結合している状態と結合していない状態を表す。 k_1^{EMM} と k_2^{EMM} はそれぞれ、EMM(1,1) から EM(0,1) と EM(1,0) への Mg^{2+} のミクロ解離定数を示し、 k_{12}^{EM} と k_{21}^{EM} はそれぞれ、EM(0,1) と EM(1,0) から E(0,0) への Mg^{2+} のミクロ解離定数を示す。

このスキームに従えば、 Mg^{2+} のある一定濃度における $|\Delta F|$ の値は次式で表される。

$$|\Delta F| = \frac{A \cdot C_M^2 + B \cdot C_M}{\frac{C_M^2}{K^{EMM} \cdot K^{EM}} + \frac{C_M}{K^{EM}} + 1} \quad (2-1-2)$$

ここで、 K^{EMM} と K^{EM} はそれぞれ、EMM から EM [= EM(1,0) + EM(0,1)] と EM から E への Mg^{2+} のマクロ解離定数を示す。また、A と B は次式で表される定数である。

$$A = \frac{|\Delta F_{EMM(1,1)}|}{K^{EMM} \cdot K^{EM}} \quad (2-1-3)$$

$$B = \frac{|\Delta F_{EM(1,0)}|}{k_{21}^{EM}} + \frac{|\Delta F_{EM(0,1)}|}{k_{12}^{EM}} \quad (2-1-4)$$

ここで、 $|\Delta F_{EMM(1,1)}|$ 、 $|\Delta F_{EM(1,0)}|$ 、および $|\Delta F_{EM(0,1)}|$ はそれぞれ、ミクロ分子種 EMM(1,1)、EM(1,0)、および EM(0,1) に関する $|\Delta F|$ 値の極限值である。Fig. 2-1-2 に示した実線は、 $1/K^{EMM} = 2.1 \times 10^2 M^{-1}$ 、 $1/K^{EM} = 5.0 \times 10^6 M^{-1}$ 、 $A = 4.7 \times 10^7 M^{-2}$ 、および $B = 7.3 \times 10^4 M^{-1}$ を式 (2-1-2) に代入して得られた理論曲線であり、実験値とよく一致することがわかった。

ここで、高親和性部位に対する Mg^{2+} の結合定数の値は非常に大きく、蛍光強度の変化率も小さいことから、透析平衡法によって高親和性部位の存在を確認した。22.3 μM SMase を含む溶液と SMase を含まない溶液を透析膜で隔てて、24 時間放置した後、それぞれの溶液中の Mg^{2+} 濃度を原子吸光法で測定したところ、SMase を含む溶液では 202 μM 、含まない溶液では 181 μM であり、SMase に結合している Mg^{2+} の濃度は 21 μM となった。この結果は、 Mg^{2+} の平衡濃度 181 μM において、1 分子の SMase に約 1 個の Mg^{2+} が結合していることを示しており、高親和性部位に 1 分子の Mg^{2+} が結合することが明らかとなった。一方、低親和性部位に対する Mg^{2+} の結合数については、SMase が 50 μM 以上の濃度では溶解しないので決定することができなかった。

第三項 酵素の変性におよぼす Mg^{2+} の影響

B. cereus 菌由来 SMase には親和性の異なる 2 つの Mg^{2+} 結合部位が存在し、低親和性部位に対する Mg^{2+} の結合が酵素活性に必須であることが明らかになった。次に、SMase の構造安定性におよぼす Mg^{2+} の影響について調べた。

1. 尿素変性に対する Mg^{2+} の効果

Fig. 2-1-3A は、1.0 mM EDTA 存在下、SMase を種々の濃度の尿素溶液中、室温で 24 時間放置した後、Trp 残基由来の蛍光スペクトルを測定した結果を示す。最大蛍光波長は尿素濃度の増大とともに長波長側へ移行し、蛍光強度は著しく減少した。7.5 M 尿素存在下におけるスペクトルが、SMase 分子に含まれる Trp 残基と等モルの *N*-acetyl-*L*-tryptophanamide 溶液 (SMase はその分子内に 6 残基の Trp を含む) のスペクトルとほぼ一致したこと

から、本酵素はこの条件で完全に変性することがわかった。

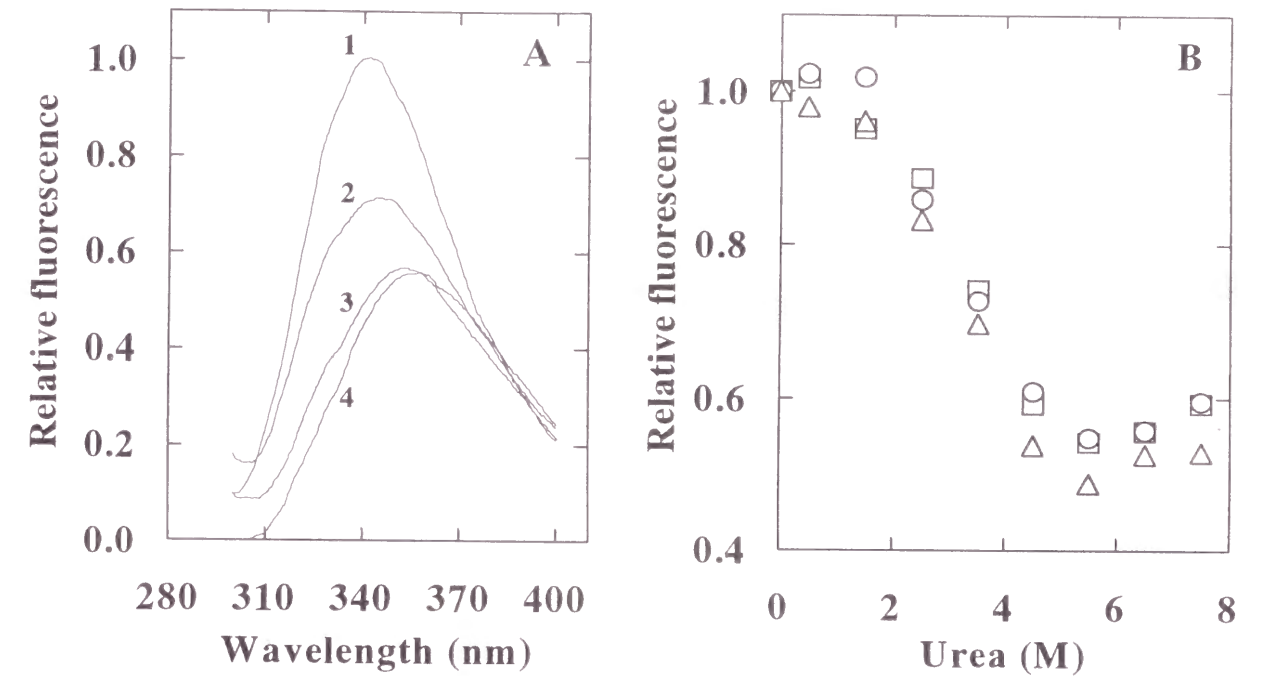


Fig. 2-1-3 Effect of Mg^{2+} on the denaturation of *B. cereus* SMase by urea. A: Fluorescence spectra of SMase excited at 290 nm. 1, 0 M urea; 2, 3.5 M urea; 3, 7.5 M urea; 4, *N*-acetyl-*L*-tryptophanamide at the same molar concentration as the tryptophan in the enzyme molecule. B: Urea denaturation curves for SMase in the presence of 0 mM (○), 0.7 mM (△), and 53 mM (□) Mg^{2+} . The fluorescence intensity, with excitation at 290 nm, was measured at 340 nm.

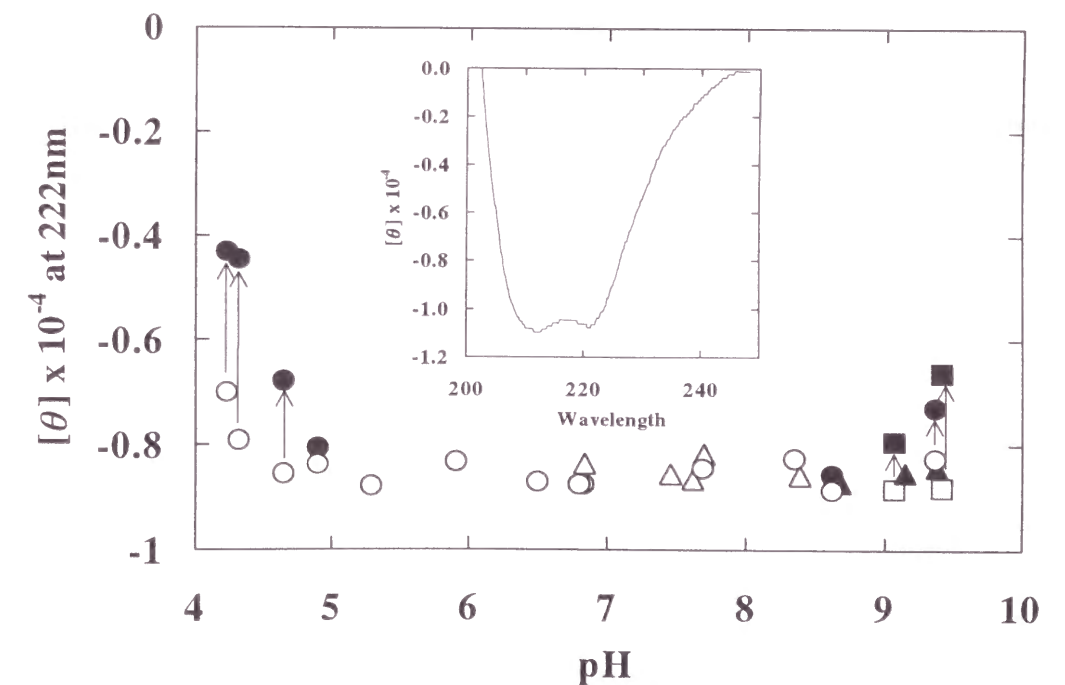


Fig. 2-1-4 pH dependence of the negative ellipticity at 222 nm of *B. cereus* SMase in the presence of 1.0 mM EDTA (circles), 1.1 μM Mg^{2+} (squares), and 22 mM Mg^{2+} (triangles). The filled symbols indicate the data after 30 min. The inset shows the CD spectrum in the presence of 1.0 mM EDTA at pH 6.83.

次に、 Mg^{2+} 非存在下、高親和性部位のみに Mg^{2+} が結合する Mg^{2+} 濃度 (0.7 mM)，および両方の部位に Mg^{2+} が結合する Mg^{2+} 濃度 (53 mM) において、SMase の 340 nm における蛍光強度の尿素濃度依存性を調べた (Fig. 2-1-3B)。その結果、SMase は 6 M 尿素存在下で完全に変性し、尿素による変性曲線は Mg^{2+} 濃度に依存しないことがわかった。

2. pH 変性に対する Mg^{2+} の効果

Fig. 2-1-4 は 1.0 mM EDTA 存在下における *B. cereus* 菌由来 SMase の遠紫外部 CD スペクトルと、222 nm における負の楕円率の pH 依存性を示す。

pH 5.0 以下と pH 9.0 以上の領域において、負の楕円率の経時的な減少が見られ、タンパク質が変性することがわかった。また、pH 9.0 以上の領域における酵素の変性は、1.1 μM Mg^{2+} (高親和性部位にのみ Mg^{2+} が結合する濃度) では保護されなかったが、22 mM Mg^{2+} (高親和性と低親和性の両方の部位に Mg^{2+} が結合する濃度) の存在により保護された。他方、酸性 pH 領域においては、SMase に対する Mg^{2+} の結合定数が非常に小さいので (詳細は第五項参照)、安定性に対する Mg^{2+} の効果を調べることができなかった。

以上の結果から、以降の実験は酵素が構造的に安定である pH 5 から 9 の範囲内で行うことにした。

第四項 HNP と SM の加水分解反応におよぼす Mg^{2+} の影響

低親和性部位に対する Mg^{2+} の結合が SMase の酵素活性に必須であることが明らかになったので、2 種類の基質 (HNP と SM) を用いて酵素反応パラメーターにおよぼす低親和性部位への Mg^{2+} 結合の影響を調べた。

Fig. 2-1-5A と Fig. 2-1-6A は、それぞれミセル状 HNP および SM と Triton X-100 との混合ミセル (1:10) を基質としたときの速度論データの Lineweaver-Burk プロットを示す。ただし、ここでは、高親和性部位が Mg^{2+} により完全に飽和される Mg^{2+} 濃度の範囲内で実験を行った (Fig. 2-1-2 参照)。見かけの最大速度 (V_{\max}^{app}) と見かけのミカエリス定数 (K_m^{app}) は非線形解析により求めた。その結果、どちらの基質の場合にも、 V_{\max}^{app} 値は Mg^{2+} 濃度の増加とともに増大したが、 K_m^{app} 値はほとんど変化しないことがわかった。

これらの結果は次に、第一章第一節第六項の式 (1-1-17), (1-1-18), および (1-1-19) に従って解析した (Fig. 2-1-5B と Fig. 2-1-6B)。ただし、SMase には 2 つの Mg^{2+} 結合部位が存在し、今回は低親和性部位に対する Mg^{2+} の結合定数が問題となるので、式 (1-1-18) と式 (1-1-19) 中の $1/K^{\text{EM}}$ と $1/K^{\text{ESM}}$ はそれぞれ、 $1/K^{\text{EMM}}$ と $1/K^{\text{ESMS}}$ で置き換えた。解析の結果、HNP を基質としたときの $1/K^{\text{EMM}}$ と $1/K^{\text{ESMS}}$ 値はそれぞれ、 $1.9 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ と $2.2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ となり、SM を基質としたときはそれぞれ、 $0.73 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ と $0.90 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ となった。ここで求めた低親和性部位に対する Mg^{2+} の結合定数の値はすべて同程度であり、Fig. 2-1-2 に示した基質非存在下で蛍光測定から求めた値ともよく一致した。

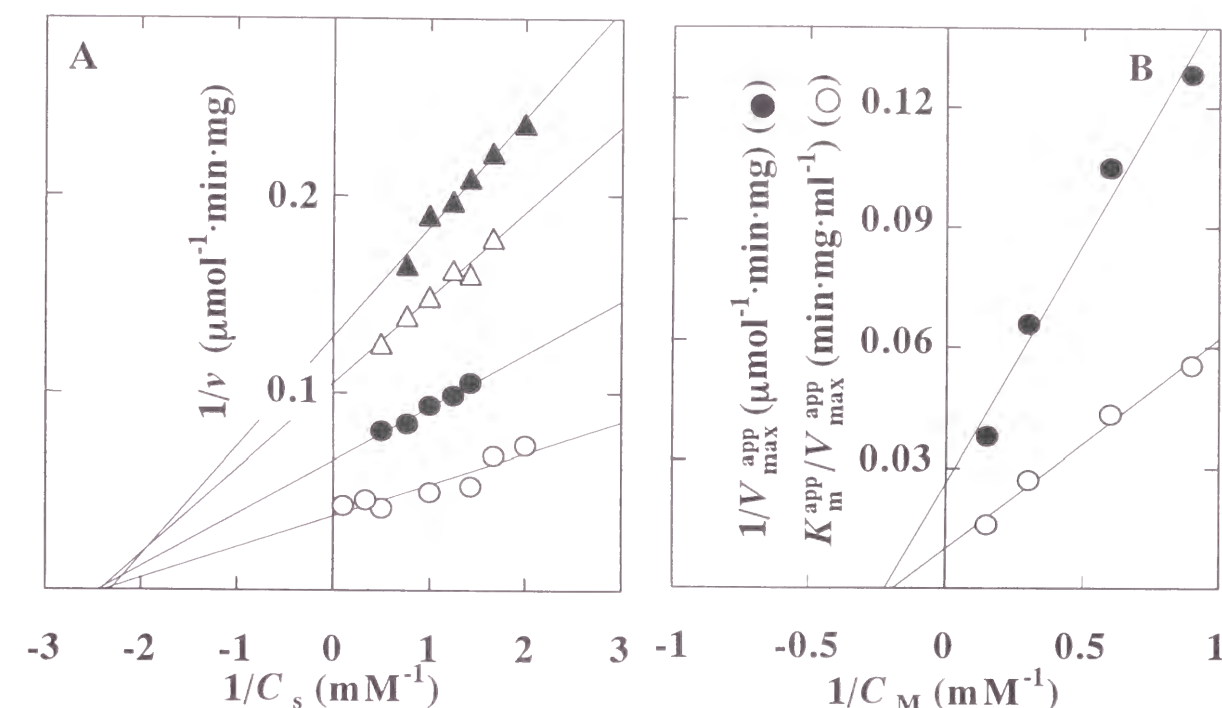


Fig. 2-1-5 Effect of Mg^{2+} on the kinetics of the hydrolysis of micellar HNP, catalyzed by *B. cereus* SMase. A: Lineweaver-Burk plots of the kinetic data in the presence of 6.67 mM (\circ), 3.33 mM (\bullet), 1.67 mM (\triangle), and 1.11 mM (\blacktriangle) Mg^{2+} . B: The reciprocal of the apparent maximum velocity, $1/V_{\max}^{\text{app}}$ (\bullet), and the apparent parameter, $K_m^{\text{app}}/V_{\max}^{\text{app}}$ (\circ), were each plotted as a function of the reciprocal of Mg^{2+} concentration, $1/C_M$, according to Eqs. 1-1-18 and 1-1-19, respectively.

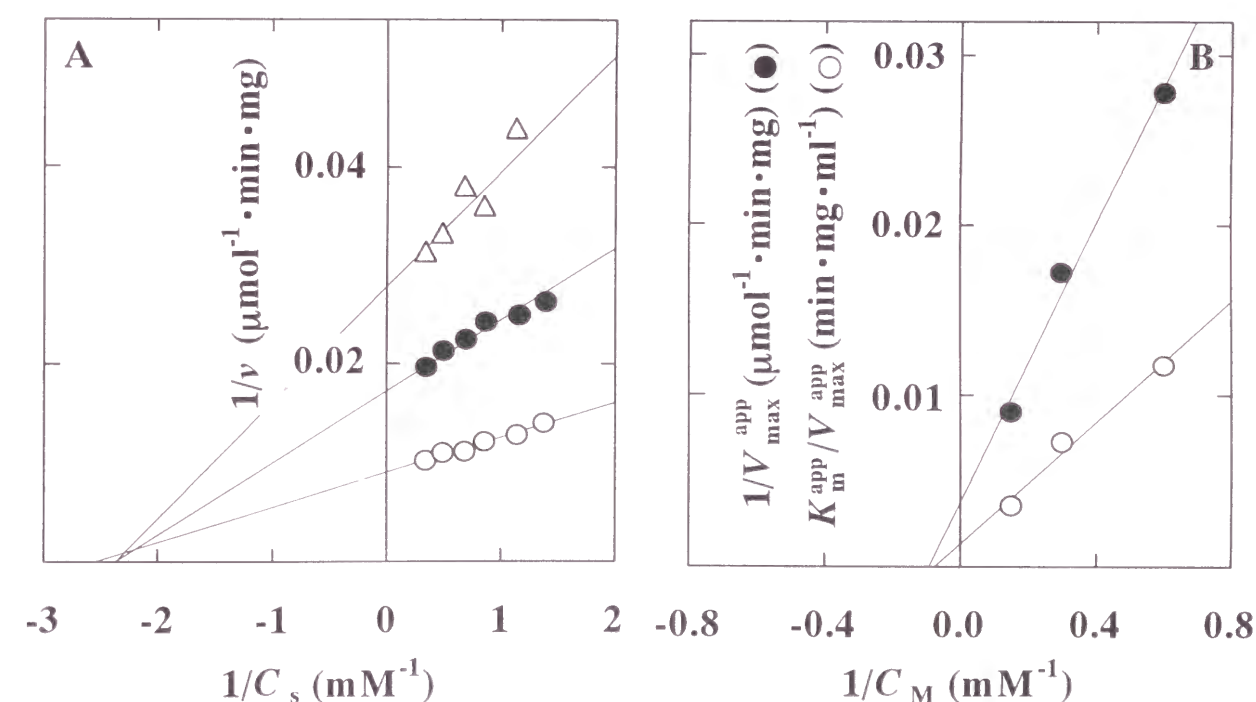


Fig. 2-1-6 Effect of Mg^{2+} on the kinetics of the hydrolysis of mixed micellar SM with Triton X-100 (1:10), catalyzed by *B. cereus* SMase. A: Lineweaver-Burk plots of the kinetic data in the presence of 6.67 mM (\circ), 3.33 mM (\bullet), and 1.67 mM (\triangle) Mg^{2+} . B: The reciprocal of the apparent maximum velocity, $1/V_{\max}^{\text{app}}$ (\bullet), and the apparent parameter, $K_m^{\text{app}}/V_{\max}^{\text{app}}$ (\circ), were each plotted as a function of $1/C_M$ according to Eqs. 1-1-18 and 1-1-19, respectively.

第五項 低親和性部位に対する Mg^{2+} の結合定数の pH 依存性

次に、 Mg^{2+} 結合に関与するアミノ酸残基のイオン化状態を明らかにするために、低親和性部位に対する Mg^{2+} の結合定数の pH 依存性を調べた。

Fig. 2-1-2 に示したように、*B. cereus* 由来 SMase の蛍光強度は Mg^{2+} 濃度の増加に伴って減少する。また、SMase の高親和性と低親和性部位に対する Mg^{2+} の結合定数は 4 桁以上異なる。そこで、高親和性部位を完全に飽和するのに十分な Mg^{2+} 濃度のもとで蛍光強度の減少を測定することにより、低親和性部位に対する Mg^{2+} の結合定数 ($1/K^{EMM}$) を求めた。Fig. 2-1-7A は、3 つの pH で得られたデータを第一章第一節第四項の式 (1-1-9) に従ってプロットした結果を示す。

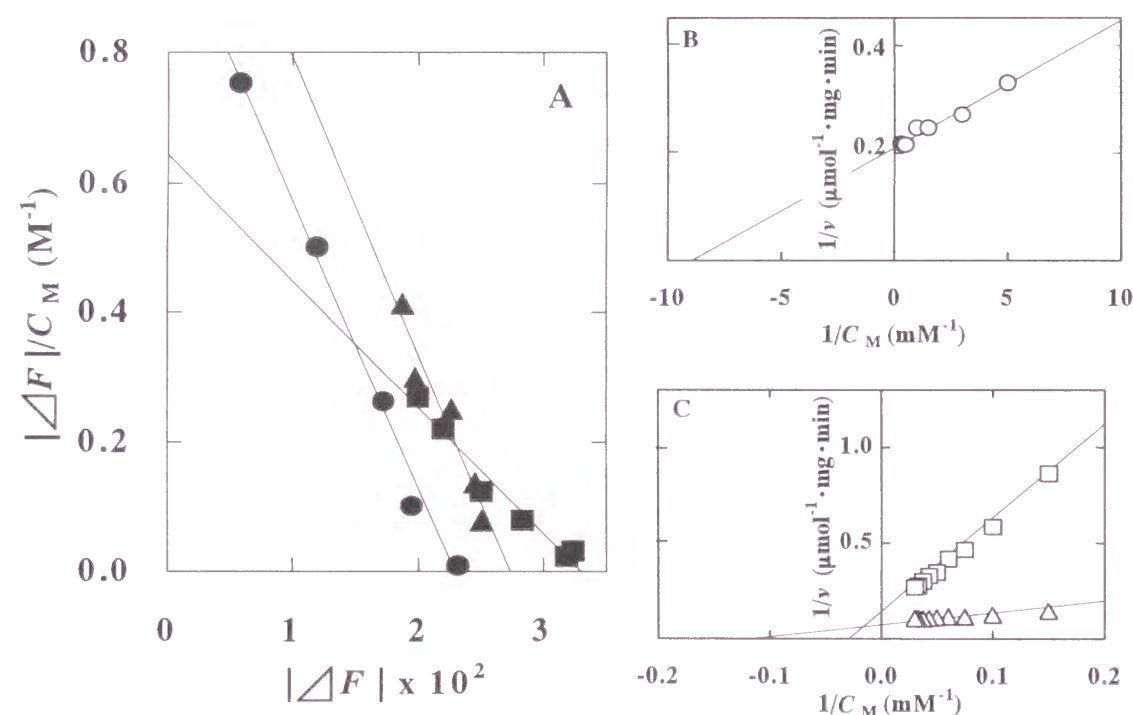


Fig. 2-1-7 Determination of the binding constant of Mg^{2+} as to the low-affinity site of *B. cereus* SMase. A: Scatchard plots of the changes in the fluorescence intensities at 340 nm, $[\Delta F]$, with the molar concentration of Mg^{2+} , C_M . ●, pH 8.31; ▲, pH 7.92; ■, pH 7.44. B and C: Double reciprocal plots of the initial velocity, v , and Mg^{2+} concentration, C_M , for the hydrolysis of micellar HNP. ○, pH 8.0; △, pH 6.0; □, pH 5.0.

他方、基質存在下における低親和性部位に対する Mg^{2+} の結合定数 ($1/K^{ESM}$) は、第四項で行った方法により求めることができるが、酵素に基質がほぼ完全に結合している条件で実験を行えば反応速度 (v) は最大速度 (V_{max}^{app}) で置きかえることができるので、第一章第一節第六項の式 (1-1-19) に従って (ただし、 K^{ESM} は K^{ESM} に置きかえて) 簡便に求めることができる。Fig. 2-1-7B と Fig. 2-1-7C は、飽和量のミセル状 HNP 存在下で求めた初速度の逆数を式 (1-1-19) に従って、 Mg^{2+} 濃度の逆数に対してプロットした結果を示す。

Fig. 2-1-8 は、Fig. 2-1-7 で求めた基質存在下と非存在下における低親和性部位に対する Mg^{2+} の結合定数を pH に対してプロットした結果を示す。この図には、Fig. 2-1-2, Fig. 2-1-5, および Fig. 2-1-6 の実験から求めた pH 5, 6, および 8 における結合定数の値も合わせて示した。それぞれの pH において $1/K^{EMM}$ と $1/K^{ESM}$ の値が互いにほぼ等しいことから、

低親和性部位への Mg^{2+} 結合は基質の結合に依存しないことが改めて確認された。また、得られた pH 依存性曲線が +1 を越える勾配をもつことから、2 つ以上のアミノ酸残基の解離が Mg^{2+} 結合に関与することが考えられたが、関与するアミノ酸残基についての情報が現時点ではほとんどないので、解析はできなかった。

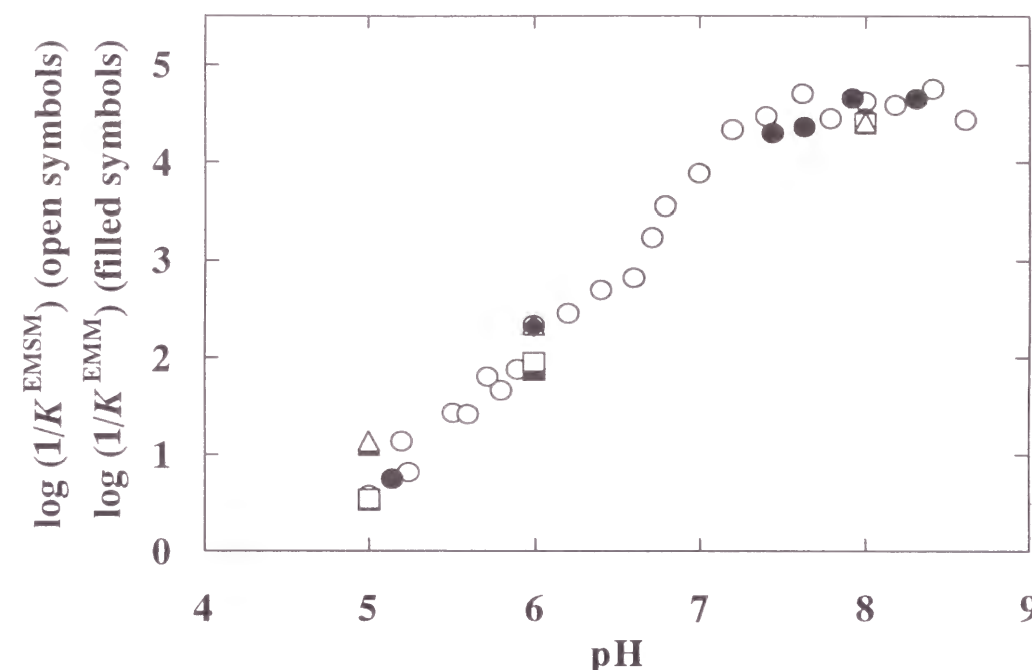


Fig. 2-1-8 pH dependence of the logarithm of the binding constant of Mg^{2+} as to the low-affinity site of *B. cereus* SMase. The $1/K^{EMM}$ (●) and $1/K^{ESM}$ (○) data were obtained from the Scatchard plots in Fig. 2-1-6A, and the double reciprocal plots in Figs. 2-1-6B and C, respectively. The data indicated by triangles and squares were obtained from the double reciprocal plots in Figs. 2-1-4B and 2-1-5B, respectively, and the filled and open symbols represent $1/K^{EMM}$ and $1/K^{ESM}$, respectively. The $1/K^{EMM}$ (◆) value was obtained from the data in Fig. 2-1-1.

第六項 HNP と SM を基質としたときの酵素反応パラメータの pH 依存性

B. cereus 菌由来 SMase は真の基質である SM の他に、合成基質である HNP をも加水分解することができる⁸⁰⁾。そこで、基質結合と触媒作用に関与するアミノ酸残基のイオン化状態を明らかにするため、これらの基質に対する酵素反応パラメータの pH 依存性を調べ比較した。

1. $1/K_m$ の pH 依存性

Fig. 2-1-9 は飽和濃度の Mg^{2+} 存在下、ミセル状 HNP および SM と Triton X-100 との混合ミセルを基質としたときの $1/K_m$ 値の pH 依存性を示す。第四項で示したように、SMase と両基質との結合定数は Mg^{2+} の存在に影響されないため、ここで示す K_m には一定濃度の Mg^{2+} 存在下で求めた K_m^{app} 値をそのまま用いた。

どちらの基質を用いた場合にも、pH 6 と 7 の間に 1 つの転移がみられたので、基質結合には 1 つのアミノ酸残基の解離が関与すると考えられた。第一章第一節第七項の 2. において 2 つの解離基が関与する場合の解析を扱ったので、そのときの式 (1-1-24) と (1-1-25)

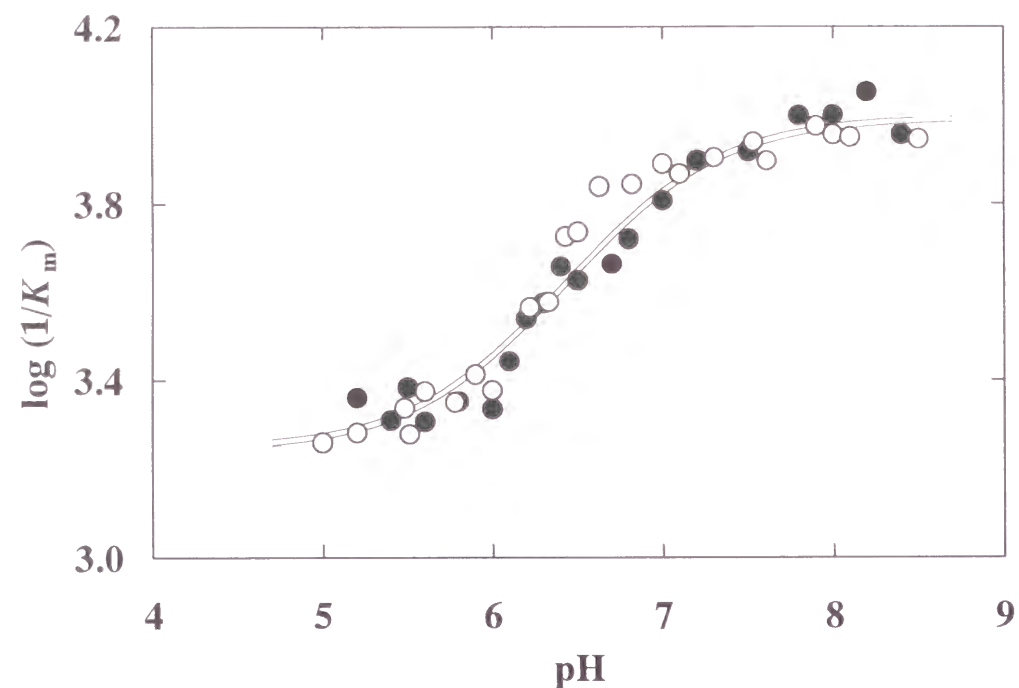


Fig. 2-1-9 pH dependence of the logarithm of $1/K_m$ for the hydrolysis of micellar HNP (○) and mixed micellar SM with Triton X-100 (1:10) (●), catalyzed by *B. cereus* SMase. The solid curves are the theoretical ones constructed according to Eq. 2-1-5 using the parameters given in the text.

を今回の場合にあてはめると，次式が得られる．

$$\log \frac{1}{K_m} = \log \frac{\frac{[H^+]}{K_{EM_2SH}} + 1}{\frac{[H^+]}{K_{EM_2H}} + 1} + \log \frac{1}{k_m} \quad (2-1-5)$$

ここで、 $K^{\text{EM}_{2\text{SH}}}$ と $K^{\text{EM}_{2\text{H}}}$ はそれぞれ酵素- Mg^{2+} -基質複合体と酵素- Mg^{2+} 複合体からの H^+ の解離定数を示し、 $1/k_m$ は問題とする解離基が完全に脱プロトン化したときの $1/K_m$ の極限值を示す。

Fig. 2-1-9 に示した実線は、HNP を基質に用いたときには $pK^{EM_2SH} = 6.05$, $pK^{EM_2H} = 6.81$, および $1/k_m = 1.00 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ を、SM を基質としたときには $pK^{EM_2SH} = 6.06$, $pK^{EM_2H} = 6.81$, および $1/k_m = 9.71 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ を式 (2-1-5) に代入して得られた理論曲線であり、実験値とよく一致することがわかった。

2. k_{cat} の pH 依存性

Fig. 2-1-10 は飽和濃度の Mg^{2+} 存在下、ミセル状 HNP および SM と Triton X-100 との混合ミセルを基質としたときの k_{cat} 値の pH 依存性を示す。ここで、 k_{cat} は SMase が Mg^{2+} で完全に飽和されているときの触媒中心活性であり、一定濃度の Mg^{2+} 存在下で決定した $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ を Fig. 2-1-8 で求めた K^{EMM} ($=K^{\text{EMSM}}$) 値により補正して求めた。

ミセル状 HNP を基質とした場合、pH 6 以下、pH 6.5 と 7 の間、および pH 7.5 以上の

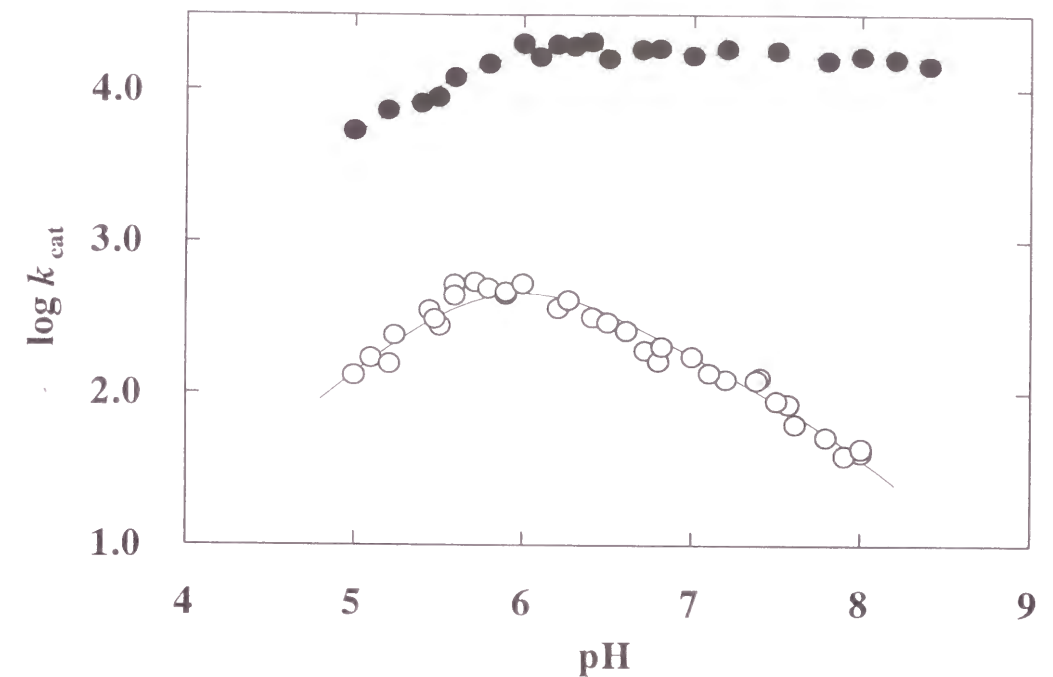
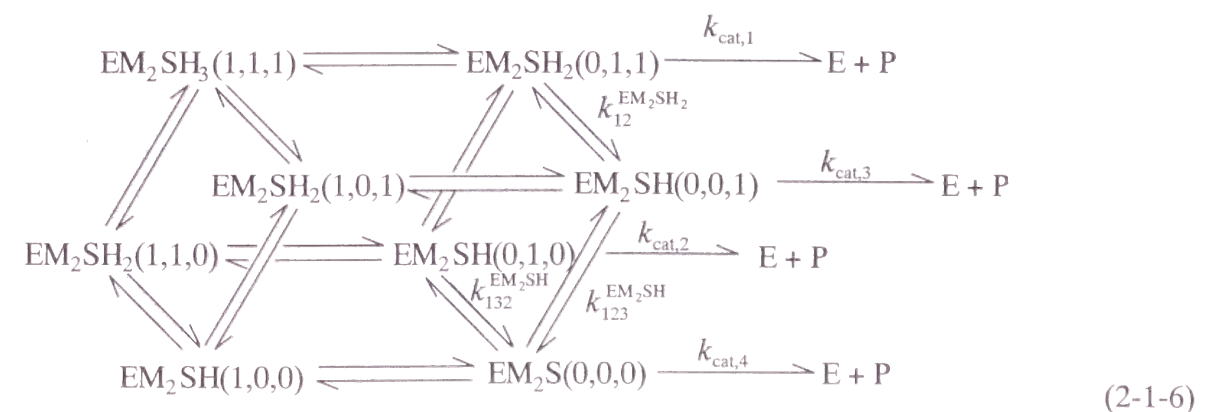


Fig. 2-1-10 pH dependence of the logarithm of $1/k_{\text{cat}}$ for the hydrolysis of micellar HNP (○) and mixed micellar SM with Triton X-100 (1:10) (●), catalyzed by *B. cereus* SMase. The solid curves are the theoretical ones constructed according to Eq. 2-1-7 using the parameters given in the text.

3つの領域に転移がみられたことから、HNP に対する触媒作用には少なくとも3つのアミノ酸残基の解離が関与すると考えられた。また、pH 6以下の領域で得られた転移の勾配は+1であり、同様の転移はSMを基質とした場合にもみられたので、この転移に関与するアミノ酸残基の脱プロトン化状態は触媒活性に必須であると考えられる。

酵素-Mg²⁺-基質複合体の3つの解離基が触媒活性に関与する場合、解離基のイオン化状態に関して8つのミクロ分子種を考える必要がある: EM₂SH₃(1,1,1), EM₂SH₂(1,1,0), EM₂SH₂(1,0,1), EM₂SH₂(0,1,1), EM₂SH(1,0,0), EM₂SH(0,1,0), EM₂SH(0,0,1), および EM₂S(0,0,0). ここで、括弧内の数字は左から順に、pH 6 以下, pH 6.5 と 7 の間, および pH 7.5 以上の領域のそれぞれの転移に関与するアミノ酸残基のイオン化状態を表し、1 はプロトン化状態を、0 は脱プロトン化状態を示す。そして、これらのミクロ分子種のうち、pH 6 以下の領域の転移に関与する解離基が脱プロトン状態にある4つの分子種のみが生成物を生じると仮定し、EM₂SH₂(0,1,1), EM₂SH(0,1,0), EM₂SH(0,0,1), および EM₂S(0,0,0) から生成物 P を生じる反応の速度定数を $k_{cat,1}$, $k_{cat,2}$, $k_{cat,3}$, および $k_{cat,4}$ として次のスキームを考えた。



このスキームに従えば、ある pH における k_{cat} 値は次式で表される。

$$\log k_{\text{cat}} = \log \frac{A \cdot [\text{H}^+]^2 + B \cdot [\text{H}^+] + C}{\frac{[\text{H}^+]^3}{K^{\text{EM}_2\text{SH}_3} \cdot K^{\text{EM}_2\text{SH}_2} \cdot K^{\text{EM}_2\text{SH}_1}} + \frac{[\text{H}^+]^2}{K^{\text{EM}_2\text{SH}_2} \cdot K^{\text{EM}_2\text{SH}_1}} + \frac{[\text{H}^+]}{K^{\text{EM}_2\text{SH}_1}} + 1} \quad (2-1-7)$$

ここで、 $K^{\text{EM}_2\text{SH}_3}$ 、 $K^{\text{EM}_2\text{SH}_2}$ 、および $K^{\text{EM}_2\text{SH}_1}$ は酵素-Mg²⁺-基質複合体の問題とする 3 つの解離基のマクロ解離定数である。また、A、B、および C は次式により表される定数である。

$$A = \frac{k_{\text{cat},1}}{k_{12}^{\text{EM}_2\text{SH}_2} \cdot k_{123}^{\text{EM}_2\text{SH}}} \quad (2-1-8)$$

$$B = \frac{k_{\text{cat},2}}{k_{132}^{\text{EM}_2\text{SH}}} + \frac{k_{\text{cat},3}}{k_{123}^{\text{EM}_2\text{SH}}} \quad (2-1-9)$$

$$C = k_{\text{cat},4} \quad (2-1-10)$$

ここで、 $k_{12}^{\text{EM}_2\text{SH}_2}$ はミクロ分子種 $\text{EM}_2\text{SH}_2(0,1,1)$ から $\text{EM}_2\text{SH}(0,0,1)$ への H⁺ のミクロ解離定数を示し、 $k_{132}^{\text{EM}_2\text{SH}}$ と $k_{123}^{\text{EM}_2\text{SH}}$ はそれぞれ、 $\text{EM}_2\text{SH}(0,1,0)$ と $\text{EM}_2\text{SH}(0,0,1)$ から $\text{EM}_2\text{S}(0,0,0)$ への H⁺ のミクロ解離定数を示す。

ミセル状 HNP を基質とした場合、pH 7.5 以上の領域にみられる転移の勾配が -1 であることから (Fig. 2-1-10)、この転移に関与する解離基のプロトン化状態もまた触媒作用に必須であるように見える。したがって、先述のミクロ分子種のうち、1 番目の解離基が脱プロトン化し、かつ 3 番目の解離基がプロトン化状態にある 2 つの分子種、 $\text{EM}_2\text{SH}_2(0,1,1)$ と $\text{EM}_2\text{SH}(0,0,1)$ のみが速度定数 $k_{\text{cat},1}$ と $k_{\text{cat},3}$ で生成物を産生すると考えることができ、式 (2-1-9) と (2-1-10) 中の $k_{\text{cat},2}$ と $k_{\text{cat},4}$ は無視できるので、式 (2-1-7) 中の B は $k_{\text{cat},3}/k_{123}^{\text{EM}_2\text{SH}}$ となり、C は 0 となる。Fig. 2-1-10 に示した HNP を基質としたときの実線は、2 番目の解離基の pK 値が $1/K_m$ の pH 依存性実験 (Fig. 2-1-9) で得られた酵素-Mg²⁺-基質複合体の pK 値 ($K^{\text{EM}_2\text{SH}_2} = 6.05$) と同じであると仮定し、式 (2-1-7) 中のパラメーター $pK^{\text{EM}_2\text{SH}_3}$ 、 $pK^{\text{EM}_2\text{SH}_1}$ 、A、および B にそれぞれ 5.85、7.60、 $4.88 \times 10^{16} \text{ M}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ 、および $4.68 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ を代入して得られた理論曲線であり、実験値とよく一致することがわかった。

他方、SM と Triton X-100 との混合ミセル状基質を用いた場合、pH 6 以下の領域に傾きが +1 の大きな転移はみられたが、アルカリ性 pH 領域においては明確な転移はみられなかった (Fig. 2-1-10)。しかし、触媒機構は基質の種類によらず共通であるはずなので、この場合にも HNP の場合と同様に、3 つの解離基が関与するとしてデータを解析した。

Fig. 2-1-10 に示した SM を基質としたときの实線は、 $1/K_m$ の pH 依存性 (Fig. 2-1-9) から求めた pK 値 ($K^{\text{EM}_2\text{SH}_2} = 6.06$)、HNP を基質としたときの k_{cat} の pH 依存性から求めた pK 値 ($K^{\text{EM}_2\text{SH}_3} = 5.85$ と $K^{\text{EM}_2\text{SH}_1} = 7.60$)、および A、B、および C の値としてそれぞれ、 $1.30 \times 10^{15} \text{ M}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $3.33 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 、および $1.64 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$ を式 (2-1-7) に代入して得られた理論曲線であり、実験値とよく一致することがわかった。

第七項 考察

1. Mg²⁺ の結合とその役割

B. cereus 菌由来 SMase の酵素活性には Mg²⁺ が必須であることから⁸⁰⁾、SMase の Trp 残基由来の蛍光スペクトル変化を利用して Mg²⁺ の結合を調べた (Fig. 2-1-2)。その結果、本酵素には少なくとも 2 つの Mg²⁺ 結合部位があり、酵素活性には低親和性部位に対する Mg²⁺ の結合が必須であることが明らかになった。また、透析平衡の実験から、このとき、高親和性部位に 1 分子の Mg²⁺ が結合していることもわかった。さらに、Fig. 2-1-5, Fig. 2-1-6, および Fig. 2-1-8 の結果から、SMase に対する基質 (HNP と SM) の結合は低親和性部位に対する Mg²⁺ の結合によって影響されないこと、すなわち両過程は互に独立であることも明らかになった。

次に、SMase の尿素変性およびアルカリ変性におよぼす Mg²⁺ の影響を調べた結果 (Fig. 2-1-3 と Fig. 2-1-4)、尿素変性は Mg²⁺ の存在により影響されなかったが、アルカリ性 pH における経時的な変性は、22 mM Mg²⁺ の存在 (高親和性と低親和性の両方の結合部位に Mg²⁺ が結合している条件) により保護された。この結果から、Mg²⁺ の低親和性部位への結合もしくは、両方の部位への結合は、静電的相互作用による安定性の破壊に伴う変性を保護するが、疎水性相互作用による安定性の破壊に伴う変性には影響しないことが考えられた。

2. SMase の触媒機構

B. cereus 菌由来 SMase の触媒機構に関する研究はほとんど行われていない。そこで、本研究では、2 種類の基質 (SM と Triton X-100 との混合ミセルおよびミセル状 HNP) を用いたときの酵素反応のパラメーター ($1/K_m$ と k_{cat}) の pH 依存性を調べ、基質との結合および触媒作用に関与するアミノ酸残基のイオン化状態を明らかにしようとした。

Fig. 2-1-9 に示したように、 $1/K_m$ の pH 依存性曲線には、どちらの基質を用いてもただひとつの転移が見られたことから、ひとつのアミノ酸残基の解離が関与すると考えられた。解析の結果、この解離基の pK 値は 6.81 であり、HNP または SM が結合するとその値がそれぞれ 6.05 と 6.06 に移行したことから、この解離基の脱プロトン化は基質との結合に極めて重要であることがわかった。この転移に関与するアミノ酸残基は変異体酵素を用いた実験から Asp 126 であることが明らかになったので、詳しい説明は次節で行う。

SMase の三次元構造は未だ明らかにされていないが、Matsuo らは⁸⁵⁾ ウシ腓臓 DNase I の立体構造を基に、*B. cereus* 菌由来 SMase の三次元構造を予測した。

X 線結晶解析の結果に基づいて Weston らが提案した DNase I の触媒機構は⁸⁷⁾、His 252 が水分子からプロトンを受け取る一般塩基として作用し、その水分子がリン酸基を求核的に攻撃し、さらに His 134 が加水分解されるリン酸エステル結合から電子を受け取る一般酸として作用するものであり、すなわち、DNase I の触媒機構は 2 つの His 残基による一般酸-塩基触媒である。DNase I と SMase の一次構造を比べると、DNase I の His 252 と His 134 はそれぞれ SMase の His 296 と His 151 に相当することがわかる⁸⁵⁾。また、この 2 つの His 残基はすべてのバクテリア由来 SMase で保存されている。さらに、これらの残基を部位特異的変異により置換すると (H296A と H151A)、酵素活性は、SM と HNP のどちらの基質

を用いた場合にも著しく低下する⁸⁵⁾。これらのことから、*B. cereus* 菌由来 SMase の触媒機構は一般酸-塩基触媒と考えられ、His 296 と His 151 はそれぞれ一般塩基触媒と一般酸触媒として作用すると思われた。

Fig. 2-1-10 に示したように、 k_{cat} の pH 依存性曲線は、HNP を基質とした場合、酸性とアルカリ性 pH 領域にそれぞれ +1 と -1 の勾配の転移を示したので、上記の一般酸-塩基触媒の機構と合致するようにみえた。しかしながら、SM を基質とした場合には、勾配 +1 の転移は酸性 pH 領域にしかみられなかったので、SMase の触媒機構はむしろ一般塩基触媒であると考えられる (Fig. 2-1-11)。

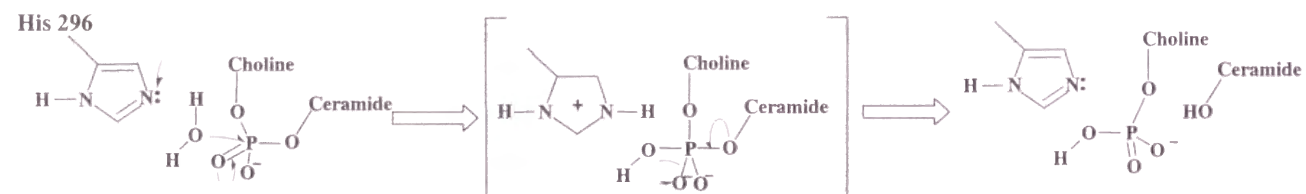


Fig. 2-1-11 The proposed catalytic mechanism of *B. cereus* SMase on the basis of general-base catalysis.

B. cereus 菌由来 SMase の立体構造の予測と今回の反応速度論の結果から、 $pK^{EM_2SH_3} = 5.83$ の解離基をもつアミノ酸残基は His 296 であり、この残基が一般塩基触媒として作用すると思えられる。また、 $pK^{EM_2SH} = 7.60$ の解離基は触媒基ではないが、HNP の触媒活性には重要な役割を果たすアミノ酸残基と思われる。しかし、それがどの残基に相当するかについては特定できなかった。

第二節 *Bacillus cereus* 菌由来スフィンゴミエリナーゼの酵素機能における Asp 126 と Asp 156 の役割

第一項 序

部位特異的変異の実験から^{83, 84)}、*B. cereus* 由来 SMase の Asp 126 と Asp 156 が基質認識に関与する可能性が示唆されたが、詳細な実験は行われていない。そこで今回、Asp 126 と Asp 156 をそれぞれ Gly に置換した酵素 (D126G と D156G) について、第二章第一節の第二項から第六項までに述べたものと同様の実験を行い、野生型酵素 (WT) の結果と比較することにより、これらの Asp 残基の役割を明確にしようとした。

第二項 変異体酵素の構造の安定性

これらのアミノ酸置換がタンパク質 SMase の構造変化を伴わないことを確認するために、野生型酵素 (WT) と変異体の遠紫外部 CD スペクトルを測定した (Fig. 2-2-1)。その結果、すべての酵素についてほぼ同様のスペクトルが得られたので、2 つの Asp 残基を Gly に置換しても全体的な構造変化は起こらないことがわかった。

また、第一節第三項の 2. で示したように、WT-SMase は pH 5 から 9 の領域において構造的に安定であった。そこで、変異体についても pH 5.0, 6.0, および 8.5 において 222 nm

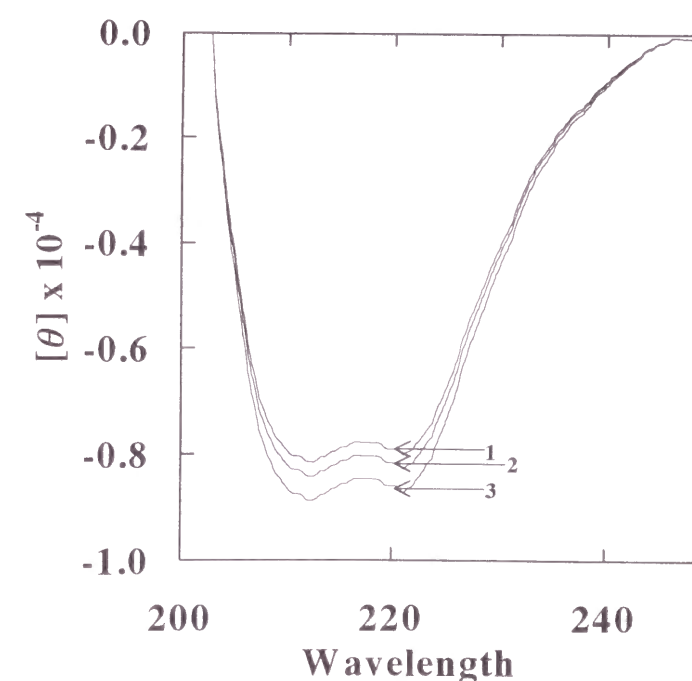


Fig. 2-2-1 The CD spectra of WT and mutant SMases. 1, D126G (1); 2, D156G; 3, WT.

における負の楕円率を測定したが、30 分以内では有意な変化のないことがわかった (Table 2-2-1)。したがって、以降の実験は pH 5.0 から 8.5 の範囲内で行うことにした。

Table 2-2-1 pH dependence of the negative ellipticities at 222nm of WT and mutant SMases.

SMase	[θ] $\times 10^{-3}$ at 222nm					
	pH 5.0		pH 6.0		pH 8.5	
	0 min	30 min	0 min	30 min	0 min	30 min
WT	-8.4	-8.3	-8.6	-8.6	-8.4	-8.5
D126G	-8.2	-8.2	-8.2	-8.1	-7.9	-7.7
D156G	-8.2	-8.3	-8.3	-8.3	-8.2	-7.9

第三項 変異体酵素による短鎖スフィンゴミエリンの加水分解

我々の研究グループは最近、SMase の単分子分散状基質として使用可能な短鎖 SM (Fig. 2-2-2) の合成法を開発した⁸⁸⁾。Table 2-2-2 は、短鎖 SM (*N*-hexanoyl- C_{10} -sphingosylphosphocholine ; C_6C_{10} SPC と *N*-hexanoyl- C_{10} -dihydrosphingosylphosphocholine ; C_6C_{10} DSPC) の光学異性体に対する WT-SMase と変異体 SMase の加水分解活性の比較を示す。*D*-erythro C_6C_{10} SPC の cmc は測定したところ 7 mM 以上であったので、今回の実験条件下 (基質濃度 3 mM) では用いたすべての短鎖 SM は単分子分散状態で存在すると考えられる。

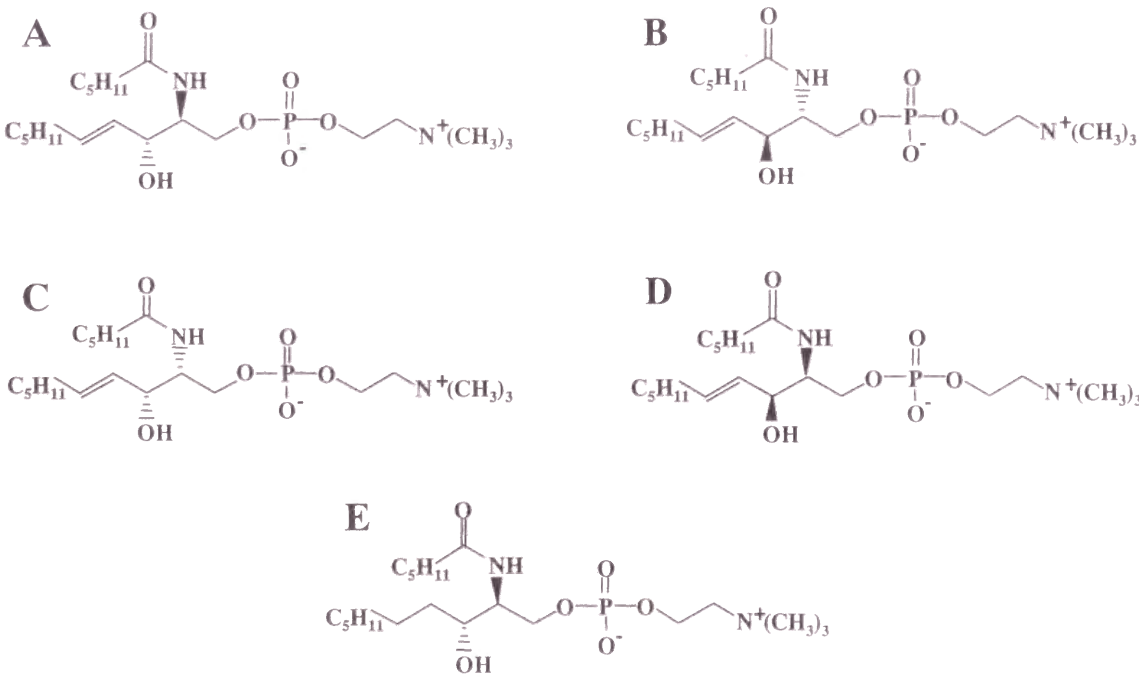


Fig. 2-2-2 Chemical structures of the stereoisomers of short-chain SM-analogs. *D*-erythro-(A), *L*-erythro-(B), *D*-threo-(C), and *L*-threo-(D) *N*-hexanoyl- C_{10} -sphingosylphosphocholine (C_6C_{10} SPC), and *D*-erythro-(E) *N*-hexanoyl- C_{10} -dihydrosphingosylphosphocholine (C_6C_{10} DSPC).

WT-SMase による *D*-erythro C_6C_{10} SPC (天然に存在する SM と同じ立体配置) の加水分解速度は他の異性体に比べて最も速かった。*L*-erythro 体と *L*-threo 体の加水分解速度は *D*-erythro 体に比べ約 10 倍低く、*D*-threo 体の速度は測定限界以下であった。一方、 C_6C_{10} SPC のジヒドロ体である *D*-erythro C_6C_{10} DSPC の加水分解速度は *D*-erythro C_6C_{10} SPC の速度と同程度であったことから、SM に含まれる二重結合は触媒活性に関与しないことがわかった。

一方、*D*-erythro C_6C_{10} SPC に対する WT-SMase の加水分解活性は D126G の活性に比べて約 2 倍高く、D156G の活性に比べて約 2 倍低かった。同様の傾向は、他の光学異性体 (*L*-erythro C_6C_{10} SPC と *D*-erythro C_6C_{10} DSPC) についても確認された (Table 2-2-2)。

Table 2-2-2 Initial velocities of the hydrolysis of short-chain SM analogues catalyzed by WT and mutant SMases.

Substrate	Activity (μ mol/min/mg)		
	WT	D126G	D156G
Monodispersed C_6C_{10} SPC			
<i>D</i> -erythro form	136.31 \pm 15.92	66.95 \pm 5.52	226.46 \pm 8.16
<i>L</i> -erythro form	19.56 \pm 1.47	8.93 \pm 1.06	37.28 \pm 0.24
<i>L</i> -threo form	11.17 \pm 1.08	—	5.68 \pm 0.70
<i>D</i> -threo form	—	—	—
Monodispersed C_6C_{10} DSPC			
<i>D</i> -erythro form	109.15 \pm 2.04	39.90 \pm 2.87	269.26 \pm 9.72

Dashed lines: not detectable

第四項 変異体酵素と Mg^{2+} との結合

第一節第二項において、WT-SMase には少なくとも 2 つの Mg^{2+} 結合部位が存在することを示した。Fig. 2-2-3 は変異体酵素についての同様な実験の結果を示す。変異体酵素においても蛍光強度の Mg^{2+} 濃度依存性曲線には 2 つの転移が見られ、さらに、低親和性部位への Mg^{2+} の結合は酵素活性に必須であることがわかった。

データを第一節第二項の式 (2-1-2) に従って解析した結果、D126G-SMase については $1/K^{EMM} = 2.1 \times 10^2 M^{-1}$, $1/K^{EM} = 5.0 \times 10^6 M^{-1}$, $A = 6.8 \times 10^7 M^{-2}$, および $B = 1.0 \times 10^5 M^{-1}$, D156G-SMase については $1/K^{EMM} = 2.1 \times 10^2 M^{-1}$, $1/K^{EM} = 1.0 \times 10^7 M^{-1}$, $A = 1.2 \times 10^8 M^{-2}$, および $B = 2.2 \times 10^5 M^{-1}$ を式 (2-1-2) に代入して得られた理論曲線は、実験値とよく一致することがわかった。このように、低親和性部位と高親和性部位に対する Mg^{2+} の結合定数の値は 2 ヶ所の Asp 残基を Gly に置換しても変化しないことがわかった。

第一節第四項に示したように、HNP と SM のどちらの基質を用いた場合にも、WT-SMase と基質との結合は低親和性部位に対する Mg^{2+} の結合により影響されなかったが、触媒活性はこの Mg^{2+} 結合に伴って著しく増大した。Fig. 2-2-4 は両変異体について SM と Triton X-100 との混合ミセルを基質としたときの速度論データの Lineweaver-Burk プロットを示す。どちらの変異体においても、 V_{max}^{app} 値は Mg^{2+} 濃度の増加とともに上昇したが、 K_m^{app} 値は変化しなかった。同様の結果は pH 5.0 と 8.0 においても、ミセル状 HNP を基質とした

場合にも得られた。

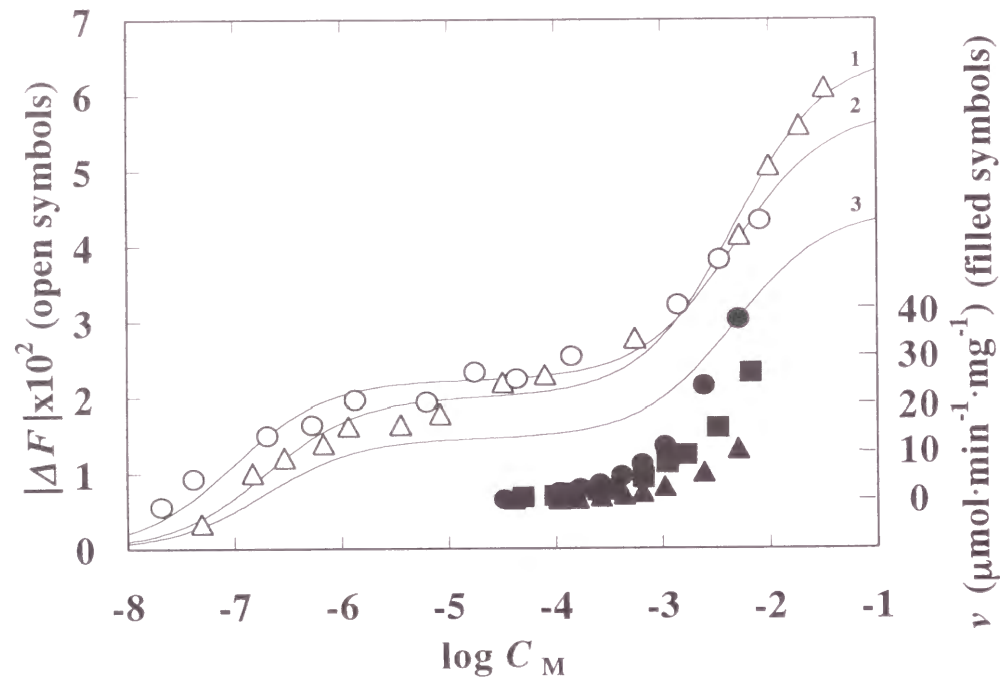


Fig. 2-2-3 Fluorescence change and initial velocity of WT and mutant SMases on addition of Mg^{2+} . The changes in the tryptophyl fluorescence at 340nm, excited at 290 nm, $|\Delta F|$, of D126G (\triangle) and D156 (\circ) SMases on addition of Mg^{2+} , plotted as a function of the logarithm of the total molar concentration of Mg^{2+} , C_M . Solid lines 1, 2, and 3 indicate the theoretical curves for D126G, D156G, and WT SMases, respectively, constructed according to Eq. 2-1-2 using the parameters given in the text. The initial velocities of the hydrolysis of micellar HNP, v , were determined for D126G (\blacktriangle), D156G (\bullet), and WT (\blacksquare) SMases. The initial velocity data for D126G plotted in this figure were magnified twenty times, since the values were too small to be plotted exactly as they were.

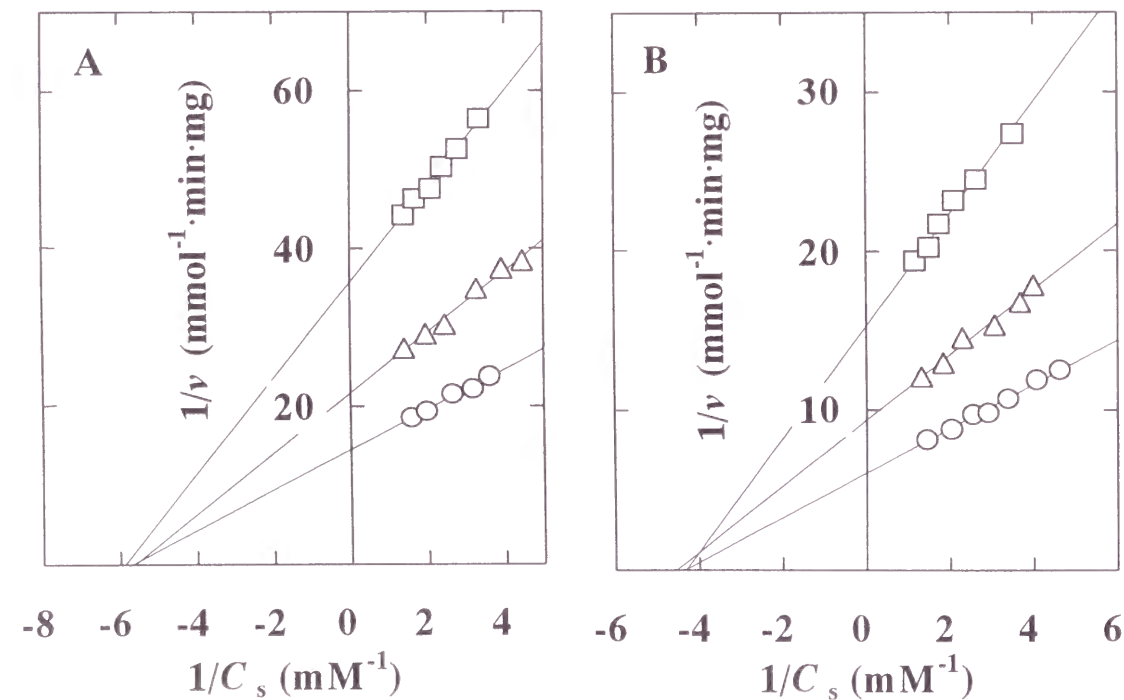


Fig. 2-2-4 Lineweaver-Burk plots of the kinetic data on the hydrolysis of micellar SM mixed with Triton X-100 (1:10) catalysed by 126G (A) and D156G (B) SMases. \circ , 13.3 mM; \triangle , 6.65 mM; \square , 3.33 mM Ca^{2+} .

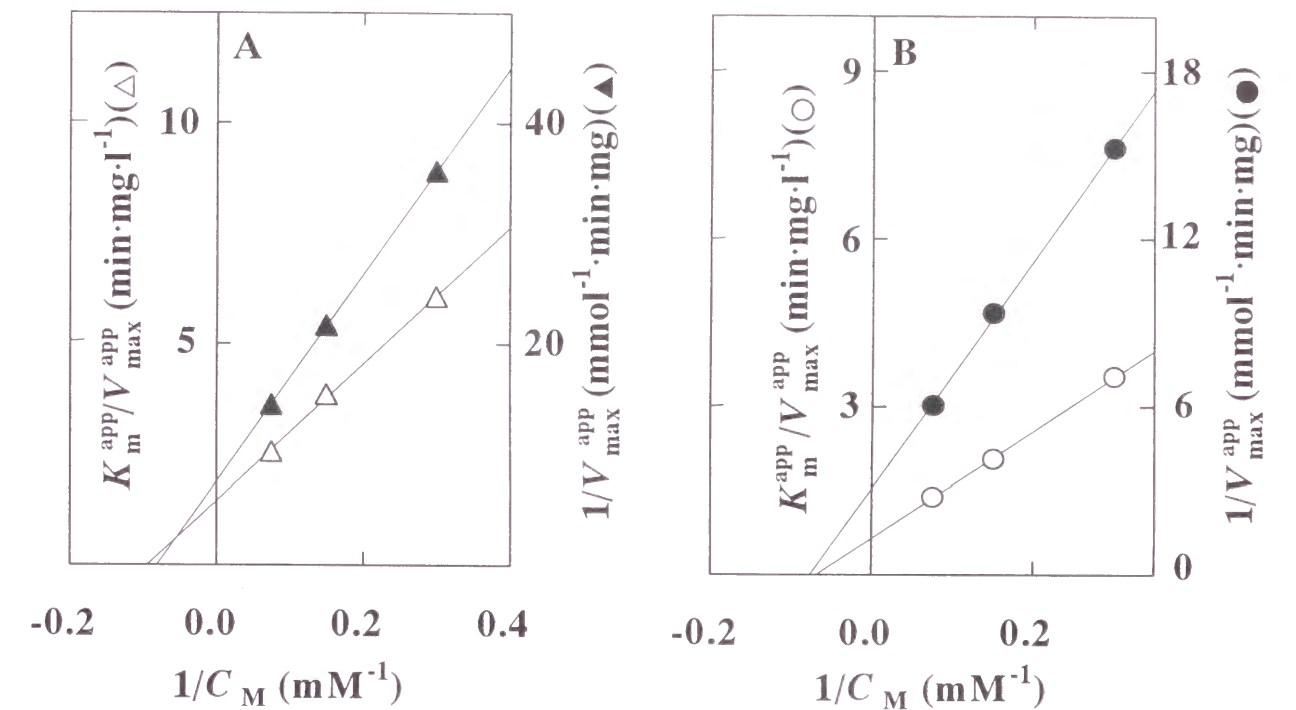


Fig. 2-2-5 Analysis of the Mg^{2+} -dependence data on the kinetic parameters of D126G (A) and D156G (B) SMases for the hydrolysis of micellar SM mixed with Triton X-100 (1:10). The reciprocal of the apparent maximum velocity, $1/V_{\max}^{\text{app}}$ (filled symbols), and the apparent parameter, $K_m^{\text{app}}/V_{\max}^{\text{app}}$ (open symbols), obtained from Fig. 2-2-3, were plotted as a function of the reciprocal of the molar concentration of Mg^{2+} according to Eqs. 1-1-18 and 1-1-19, respectively.

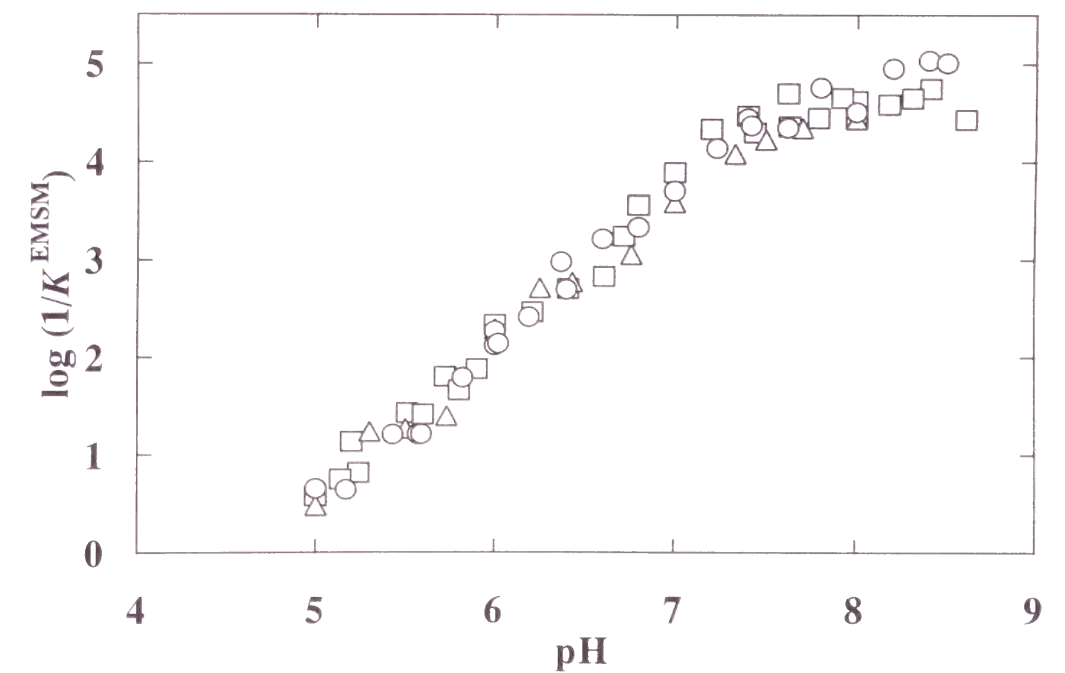


Fig. 2-2-6 pH-dependence of the logarithm of the binding constant of Mg^{2+} to the low-affinity site of D126G (\triangle), D156G (\circ), and WT (\square) SMases.

次に、第一節第四項のときと同様に、Fig. 2-2-4 のデータを再プロット (Fig. 2-2-5) した結果、D126G の $1/K^{\text{EMM}}$ と $1/K^{\text{EMSM}}$ 値はそれぞれ $9.3 \times 10^1 \text{ M}^{-1}$ と $8.0 \times 10^1 \text{ M}^{-1}$ (Fig. 2-2-5A) と、D156G のそれぞれの値は $6.7 \times 10^1 \text{ M}^{-1}$ と $7.6 \times 10^1 \text{ M}^{-1}$ (Fig. 2-2-5B) となった。これら

の値はすべて同程度であり, Fig. 2-2-3 に示した蛍光測定から直接求めた $1/K^{\text{EMM}}$ 値とも一致した. 同様の結果は pH 5.0 と 8.0 においても得られた. また, ミセル状 HNP を基質とし, pH 5.0, 6.0, および 8.0 で行った実験においても同様の結果が得られた.

第一節第五項では WT-SMase の低親和性部位に対する Mg^{2+} の結合定数の pH 依存性を示した. 変異体酵素についても同様の実験を行ったが (Fig. 2-2-6), WT と変異体に対する Mg^{2+} の結合定数の値は, 測定した pH 範囲内では同程度であった.

第五項 変異体酵素による HNP と SM を基質としたときの酵素反応パラメーターの pH 依存性

第一節第六項に示した WT-SMase に関する実験と同様に, 変異体酵素についても酵素

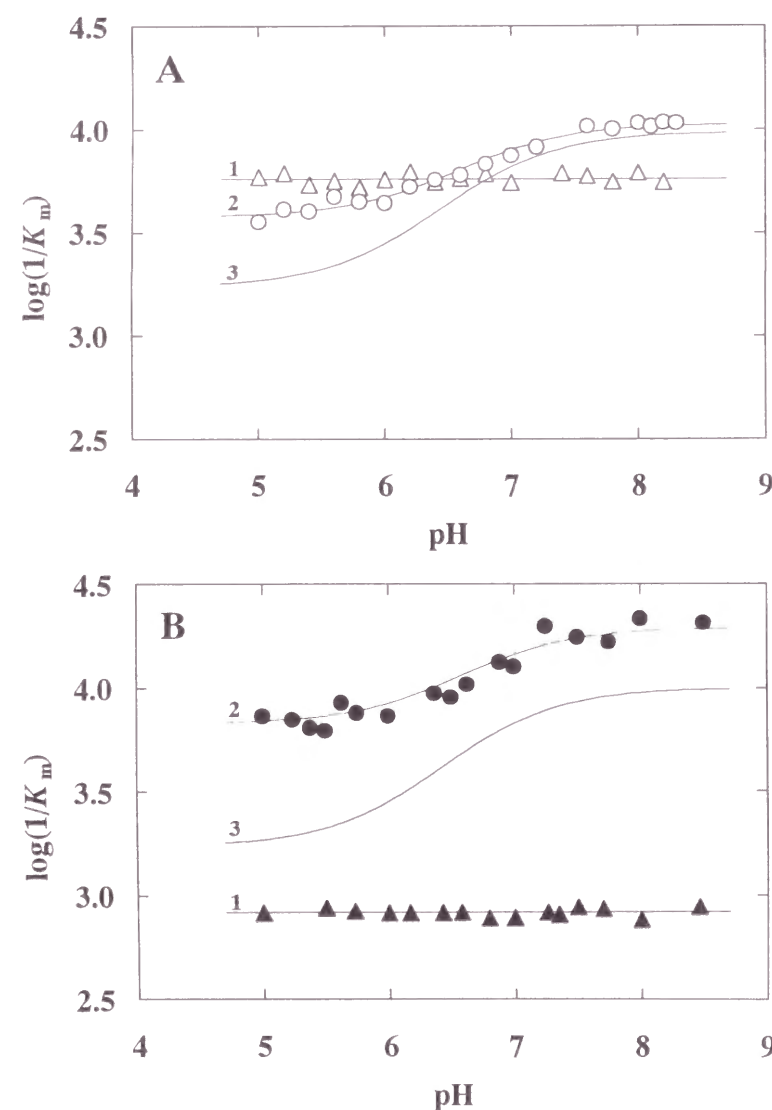


Fig. 2-2-7 pH-dependence of the logarithm of $1/K_m$ of D126G (triangles) and D156G (circles) SMases for the hydrolysis of micellar SM mixed with Triton X-100 (1:10) (A) and micellar HNP (B). Solid lines 1, 2, and 3 indicate the theoretical curves for D126G, D156G, and WT SMases, respectively, constructed according to Eq. 2-1-5 using the parameters given in the text.

反応パラメーターの pH 依存性を調べた.

Fig. 2-2-7A は SM と Triton X-100 との混合ミセルを基質としたときの, Fig. 2-2-7B は ミセル状 HNP を基質としたときの $1/K_m$ の pH 依存性を示す. D156G の pH 依存性曲線には, どちらの基質の場合にも, pH 6 と 7 の間にひとつの転移が見られたので, D156G の基質結合にはひとつのアミノ酸残基のイオン化状態が関与することが示唆された. 一方, D126G の場合には転移が全くみられなかったので, 基質結合にはアミノ酸残基のイオン化状態は全く関与しないことがわかった.

D156G の結果は第一節第六項の 1. に示した WT-SMase の場合と同様に解析した. Fig. 2-2-7 に示した実線は, SM を基質としたとき $pK^{\text{EM}_2\text{SH}} = 6.36$, $pK^{\text{EM}_2\text{H}} = 6.81$, および $1/k_m = 1.07 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ を, HNP を基質としたとき $pK^{\text{EM}_2\text{SH}} = 6.35$, $pK^{\text{EM}_2\text{H}} = 6.81$, および $1/k_m = 1.95 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ を第一節第六項の式 (2-1-5) に代入して得られた理論曲線であり, 実験値とよく一致することがわかった. 一方, D126G の $1/K_m$ 値は, どちらの基質の場合にも pH に依存しなかったので, $1/K_m$ の平均値を SM の場合には $5.75 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, HNP の場合には $8.32 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ として直線で示した.

Fig. 2-2-8 は k_{cat} の pH 依存性を示す. D126G の場合には, どちらの基質の場合にも pH 6 以下と pH 7.5 以上の 2 つの領域に大きな転移がみられ, 触媒活性には 2 つのアミノ酸残基のイオン化状態が関与すると考えられた. また, これらの転移の勾配がそれぞれ +1 と -1 であることから, 酸性 pH 側の解離基の脱プロトン化および, アルカリ性 pH 側の解離基のプロトン化が触媒作用に必須であるようにみえた.

酵素-基質- Mg^{2+} 複合体中の 2 つの解離基が触媒活性に関与する場合, 解離基のイオン化状態に関して 4 種類のミクロ分子種の存在を考える必要がある. 先に述べたように, これらの分子種のうち, 酸性 pH 側の解離基が脱プロトン化し, アルカリ性 pH 側の解離基がプロトン化している分子種のみが生成物を生じると考え, またそのときの速度定数を $k_{\text{cat},1}$ とすると, 触媒中心活性 k_{cat} は次式で表される.

$$\log k_{\text{cat}} = \log \frac{D \cdot [\text{H}^+]}{\frac{[\text{H}^+]^2}{K^{\text{EM}_2\text{SH}_3} \cdot K^{\text{EM}_2\text{SH}_1}} + \frac{[\text{H}^+]}{K^{\text{EM}_2\text{SH}_1}} + 1} \quad (2-2-1)$$

ここで, $K^{\text{EM}_2\text{SH}_3}$ と $K^{\text{EM}_2\text{SH}_1}$ は酵素-基質- Mg^{2+} 複合体中の問題とする 2 つの解離基のマクロ解離定数を示す. D は次式で表される定数である.

$$D = \frac{k_{\text{cat},1}}{k_1^{\text{EM}_2\text{SH}_1}} \quad (2-2-2)$$

ここで, $k_1^{\text{EM}_2\text{SH}_1}$ は酵素-基質- Mg^{2+} 複合体の酸性側の解離基が脱プロトン化し, アルカリ性側の解離基がプロトン化しているミクロ分子種からの H^+ のミクロ解離定数を示す.

Fig. 2-2-8 に示した D126G の実線は, SM を基質としたとき $pK^{\text{EM}_2\text{SH}_3} = 5.85$, $pK^{\text{EM}_2\text{SH}_1} = 7.60$, および $D = 3.23 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ を, HNP を基質としたとき $pK^{\text{EM}_2\text{SH}_3} = 5.85$,

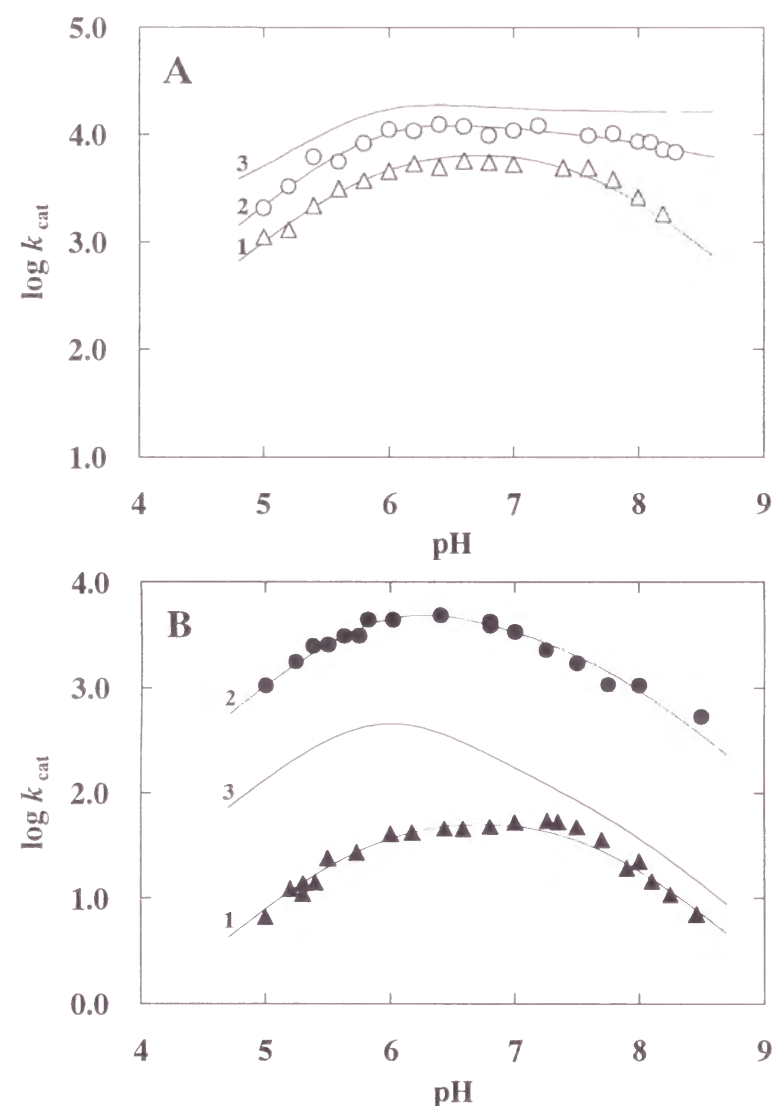


Fig. 2-2-8 pH-dependence of the logarithm of k_{cat} of D126G (triangles) and D156G (circle) SMases for the hydrolysis of micellar SM mixed with Triton X-100 (1:10) (A) and micellar HNP (B). Solid lines 1, 2, and 3 indicate the theoretical curves for D126G, D156G, and WT SMases, respectively, constructed according to Eqs. 2-1-7 or 2-2-1 using the parameters given in the text.

$\text{pK}^{\text{EM}_2\text{SH}_1} = 7.60$, および $D = 2.54 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ を式 (2-2-1) に代入して得られた理論曲線であり、実験値とよく一致することがわかった。

D156G は、WT の結果と同様の曲線を示したので、第一節第六項の 2. に示した式 (2-1-7) に従って解析した。2 番目の解離基の pK 値として、 $1/K_m$ の pH 依存性 (Fig. 2-2-7) から求めた値 (SM では $\text{pK}^{\text{EM}_2\text{SH}_2} = 6.36$, HNP では 6.35) を、1 番目と 3 番目の解離基の pK 値として、D126G の k_{cat} の pH 依存性から求めた値 ($\text{pK}^{\text{EM}_2\text{SH}_3} = 5.85$ および $\text{pK}^{\text{EM}_2\text{SH}_1} = 7.60$) を用いた。解析の結果、SM を基質としたとき、 $A = 6.30 \times 10^{18} \text{ M}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$, $B = 1.68 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, および $C = 4.44 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ を、HNP を基質としたとき、 $A = 7.47 \times 10^{17} \text{ M}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$, $B = 1.25 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, および $C = 0 \text{ min}^{-1}$ を式 (2-1-7) に代入して得られた理論曲線は、実験値とよく一致することがわかった。なお、HNP を基質としたとき、3 番目の

解離基のプロトン化は触媒作用に必須であるようにみえたので、式 (2-1-7) 中の定数 C は 0 とした。

第六項 考察

1. Mutant SMase による短鎖 SM の加水分解反応

Table 2-2-2 に示したように、単分子分散状基質 *D*-erythro $\text{C}_6\text{C}_{10}\text{SPC}$ (天然の SM と同じ立体配置) の WT-SMase による加水分解速度は他の光学異性体よりも高く、その dihydro 体と同程度であったことから、基質分子の立体配置は加水分解に重要であるが、二重結合はほとんど関与しないことがわかった。以前、Barnholz らは⁸⁹⁾、*N*-palmitoyl-SPC および *N*-palmitoyl-DSPC の種々の異性体と Triton X-100 との混合ミセルを基質として、ラット脳由来 SMase の部分精製品の活性を調べ、*D*-erythro 体の加水分解速度は *L*-erythro 体の速度よりも約 5 倍も速く、二重結合は加水分解に影響しないことを示した。この結果は、今回の実験結果とよく一致する。

また、Table 2-2-2 に示したように、WT と 2 つの変異体酵素 (D126G と D156G) の基質に対する立体選択性に違いがなかったことから、Asp 126 と Asp156 は立体選択性に関与しないことがわかった。

以前、池澤らは^{83,84)} 4 種類の基質 (SM, HNP, lysophosphatidylcholine ; lyso-PC, および *p*-nitrophenylphosphocholine ; *p*-NPPC) に対する D126G と D156G SMase の加水分解活性を測定し、WT の活性と比較した。その結果、HNP と *p*-NPPC に対する D156G の加水分解活性は WT の活性よりも高いことがわかった。HNP と *p*-NPPC は共に水溶性でかつ *p*-nitrophenyl 基をもつので、これらのことが D156G の高い加水分解活性の原因と考えられた。しかし、今回の実験において、D156G の高い加水分解活性は単分子分散状短鎖 SM に対しても得られたので、それは基質の親水性に起因すると考えられ、Asp 156 は本来、親水性基質の加水分解反応を抑制する作用をもつことが示唆された。

2. Mg^{2+} の結合におよぼす Asp 126 と Asp156 の Gly への置換の影響

Fig. 2-2-3 ~ 2-2-6 に示したように、D126G, D156G, および WT SMase に対する Mg^{2+} の結合様式と結合定数はほぼ同じであった。このことは、Asp 126 と Asp 156 は Mg^{2+} 結合に関与しないことを示す。

3. ミセル状基質に対する酵素活性における Asp 126 と Asp156 の役割

Fig. 2-2-7 に示したように、D156G の $1/K_m$ の pH 依存性曲線はどちらの基質の場合にも同じ形状をしており、 $\text{pK} = 6.81$ をもつひとつの解離基の関与による転移を示した。この結果は WT の場合と本質的に同じであった。一方、D126G の基質結合には、どちらの基質の場合にも解離基の関与はなかった。したがって、WT や D156G の基質結合に関与するアミノ酸残基は Asp 126 であると結論される。

今回の実験で得られた Asp 126 の pK 値 6.81 は正常な Asp 残基の pK 値 (約 4) と比

べて異常に高い値である。 *Eschesia coli* 由来 thioredoxin の Asp 26 はタンパク質の疎水性グロブ中に完全に埋もれており、その *pK* 値は 7.5 であることが報告されている⁹⁰⁾。さらに、その還元型では、Asp 26 の近傍の解離した Cys 32 の負荷電のために *pK* 値は 9.2 になるという。 3-oxo- Δ^5 -steroid isomerase の Asp 99 も *pK* 8.5 という高い値をもつことが報告されている⁹¹⁾。この残基の側鎖も疎水性の環境にあり、近傍に存在する Asp 38 の負電荷による静電効果を受けている。このような例から推測すると、SMase の Asp 126 は疎水的環境にあり、かつ／または近傍には負電荷をもつアミノ酸残基が存在するのではないかと考えられる。

また、WT の 126 位のアミノ酸残基が負の電荷をもたないような酸性 pH における $1/K_m$ の値を基準として考えると、HNP を基質として用いたときの D126G の場合を除き、D126G や D156G の $1/K_m$ 値は WT の値よりも高い。したがって、SMase の Asp 156 には本来、HNP や SM の結合を低下させる能力があり、Asp 126 には SM の結合を低下させるが HNP の結合は増大させる能力のあることが示唆される。

Fig. 2-2-8 に示したように、D156G の k_{cat} の pH 依存性曲線の形状は WT の曲線と本質的に同じであった。一方、D126G の k_{cat} の pH 依存性曲線はどちらの基質の場合にも、pH 6 以下と pH 7.5 以上の領域に勾配がそれぞれ +1 と -1 の転移を示したが、WT や D156G のときにみられた pH 6.5 と 7 の間の転移は示さなかったことから、後者の転移は Asp 126 によるものと考えられ、その脱プロトン化は触媒作用を低下させることが明らかになった。

次に、 k_{cat} の pH 依存性を解析するにあたり次の 3 つの仮定を設けた。(1) SMase の触媒機構は、加水分解される基質の種類にかかわらず基本的には同一と考え、共通して 3 つのアミノ酸残基の解離基が触媒作用に関与する。(2) *pK* 値が 6.0 から 6.5 の間にあるアミノ酸残基は Asp 126 であるため、D126G SMase の触媒中心活性には Asp 126 以外の 2 つの解離基に関与する。(3) 触媒作用に関与する Asp 126 以外の 2 つのアミノ酸残基のそれぞれの *pK* 値は、酵素や基質の違いにかかわらず、同じ値とする。以上の仮定に基づいて得られた *pK* 値は Table 2-2-3 に要約した。これらの *pK* 値を用いて得られた理論曲線は実験値とよく一致した (Fig. 2-2-7 および Fig. 2-2-8)。

Table 2-2-3 Comparison of the *pK* values of ionizable groups participating in the substrate binding and catalytic activity of WT and mutant SMases.
The *pK* values were determined according to Eqs. 2-1-5, 2-1-7, and 2-2-1 using the parameters given in the text.

Substrate	SMases	log (1/ <i>K_m</i>)		log <i>k_{cat}</i>		
		<i>pK</i> ^{EM₂SH}	<i>pK</i> ^{EM₂H}	<i>pK</i> ^{EM₂SH₃}	<i>pK</i> ^{EM₂SH₂}	<i>pK</i> ^{EM₂SH₁}
SM	WT	6.06	6.81	5.85	6.06	7.60
	D126G	—	—	5.85	—	7.60
	D156G	6.36	6.81	5.85	6.36	7.60
HNP	WT	6.05	6.81	5.85	6.05	7.60
	D126G	—	—	5.85	—	7.60
	D156G	6.35	6.81	5.85	6.35	7.60
Putative residues		Asp126		His 296	Asp 126	?

Dashed lines; not determined

Fig. 2-2-8 に示したように、HNP を基質としたときの D156G の k_{cat} 値を除き、変異体 SMase の k_{cat} 値は、すべての pH で WT の値よりも小さかった。この結果は、SMase の Asp 126

には本来、どちらの基質に対しても触媒活性を増大させる能力があることを示す。また、Asp 156 には本来、SM に対する触媒活性は増大させるが、HNP に対する触媒活性は低下させる能力のあることが示された。

今回の実験結果から Asp 126 の *pK* 値を決定することができた。しかし、Asp 126 がプロトン化している（イオン化していない）酸性 pH 領域において、WT と 2 つの変異体酵素（D126G と D156G）の酵素反応パラメーターの値に大きな違いがあったことは、Asp 126 の解離だけでは説明できない。もし、これらの Asp 残基を Gly ではなく Ala や Asn などに置換した変異体酵素を用いたならば、これほど大きな違いはなかったかもしれない。Asp を Gly に置換したことによる酵素反応パラメータの大きな変化は、SMase の Asp 126 と Asp 156 のイオン化状態の変化による影響だけでなく、微視的なコンホメーション変化などの他の要因によるのかもしれない。

B. cereus 菌由来 SMase の高次構造予測の研究によれば⁸⁵⁾、2 つの Asp 残基（Asp 126 と Asp 156）は触媒部位の周辺にあって、本酵素に含まれる唯一のジスルフィド結合の組（Cys 125 と Cys157）の隣に存在するという。また、Fig. 2-2-1 と Table 2-2-1 に示したように、変異酵素の 222 nm における負の楕円率は WT の値とほとんど同じであったので、これらの Asp 残基を Gly に置換しても全体的な立体構造の変化はないと考えられる。変異体を用いた今回の結果から、Asp 126 のイオン化は基質との結合を増大させ、触媒作用を低下させることが明らかになったことから、Asp 126 は酵素の触媒部位近傍に存在することが証明された。また、Asp を Gly に置換することにより、酵素反応パラメーターの値が変化したのは、酵素の触媒部位の微視的な構造変化によるものと考えられる。

結論

本研究では、リン脂質加水分解酵素である PLA₂ と SMase について酵素反応速度論に基づく実験を行い、以下の点を明らかにした。

1. I 型と II 型 PLA₂ の触媒機構について

I 型と II 型に属する PLA₂ は高次構造がほぼ同じなので触媒機構も同じであると考えられていた。しかし、I 型 PLA₂ の BPB 反応と単分子分散状およびミセル状基質の加水分解反応には N 末端の α アミノ基が関与するが、II 型 PLA₂ においては全く関与しないという I 型と II 型 PLA₂ の著しい違いが明らかになった。他方、Ca²⁺ 結合については、 α アミノ基が関与する PLA₂ と関与しないものがあり、必ずしも I 型と II 型の分類に従うものではなかった。しかし、アルカリ性 pH 領域においては、すべての PLA₂ の Ca²⁺ に対する結合定数が等しくなったことから、Ca²⁺ 結合に関与するすべてのアミノ酸残基が脱プロトン化すると、PLA₂ に対する Ca²⁺ の結合様式は、PLA₂ の型によらず共通であることがわかった。

2. I 型および II 型 PLA₂ と基質との結合におよぼす Ca²⁺ の影響について

真の基質と I 型 PLA₂ との結合は Ca²⁺ の存在に影響されないのに対し、II 型 PLA₂ との結合力は Ca²⁺ の存在により著しく増大した。I 型と II 型 PLA₂ でみられたこのような違いは、Ca²⁺ 結合部位や基質結合部位のアミノ酸残基が保存されていない PLA₂ においてもみられたので、これらの部位のアミノ酸残基の違いでは説明できなかった。他方、真の基質の 2 位のエステル結合をアミド結合に置換した amide-PC の結合力は、どちらの酵素においても Ca²⁺ に依存して著しく増大したが、アミドプロトンが欠如した oxazolidinone-PC の結合力は、Ca²⁺ の影響に関して真の基質の場合と同様の傾向を示した。amide-PC は触媒基 His 48 との間に水素結合を形成することが知られているが、真の基質と oxazolidinone-PC はアミドプロトンをもたないため水素結合を形成できないことがその原因であると考えられる。以上の結果から、I 型と II 型 PLA₂ の触媒部位周辺の微視的なコンホメーションは互いに異なり、His 48 と水素結合できる amide-PC のような基質アナログが結合するに伴って、両者は同一化することが示唆された。

3. MLD-analog による I 型と II 型 PLA₂ の不活性化について

MLD-analog による PLA₂ の不活性化反応は I 型と II 型 PLA₂ の間で明確な違いはみられなかった。不活性化は Lys 残基の化学修飾により起こるので、PLA₂ の型によらず、存在する Lys 残基の数と位置の違いにより不活性化の程度が異なることがわかった。触媒部位において、基質結合に重要であるとされる 69 位が Lys である PLA₂ は単分子分散状基質に対しても不活性化が見られたが、69 位が Tyr である PLA₂ は単分子分散状基質に対しては不活性化が見られなかったことから、69 位の Lys の修飾が不活性化に関与することが示唆された。また、ウシ膵臓由来 PLA₂ では Lys 56 が修飾されることが明らかになり、この Lys 残基は基質ミセルの油水界面認識に関与していることが示唆された。さらに、触媒部位や界面認識部位以外の場所に存在する Lys 残基が修飾されても不活性化が起こることが示唆

された。

4. B. cereus 菌由来 SMase の触媒機構について

SMase の高次構造は未だ決定されておらず、その詳細な触媒機構は不明である。本研究では、*B. cereus* 菌由来 SMase の触媒機構を解明すべく酵素反応速度論に基づく実験を行った。

B. cereus 菌由来 SMase には親和性の異なる 2 つの Mg²⁺ 結合部位が存在し、低親和性部位に対する Mg²⁺ の結合は触媒活性に必須であるが、基質結合には関与しないことがわかった。また、低親和性部位もしくは両方の部位に対する Mg²⁺ の結合は、静電的相互作用による安定化の破壊に基づく酵素の変性を保護する働きがあることもわかった。次に、酵素反応パラメーターの pH 依存性データを DNase I の高次構造から推定された SMase の構造モデルをもとに考察した結果、SMase の触媒機構は His 296 (pK 5.85) による一般塩基触媒であることが推定された。基質として水溶性の合成基質 HNP を用いた場合には、さらに、pK 値 7.6 の解離基も触媒活性に非常に重要であることが明らかになった。

アミノ酸残基の化学修飾や部位特異的置換の実験から SMase の酵素活性には酸性アミノ酸残基が関与することが示されている。そこで、基質認識に関与するのではないかと考えられている Asp 126 と Asp 156 に注目し、それらの役割を明確にするため、それぞれの残基を Gly に置換した酵素 (D126G と D156G) について実験を行った。その結果、これらの 2 つの Asp 残基は、Mg²⁺ との結合や基質に対する立体選択性に影響しないが、Asp 126 のイオン化 (脱プロトン化) (pK 値は 6.81) は基質との結合力を増大させ、触媒作用を低下させることが明らかになった。また、Gly に置換したことによる微視的な構造変化によるとも考えられるが、Asp 126 は酵素の触媒活性を強め、HNP との結合力を増大させるが、SM との結合力は低下させるように寄与し、Asp 156 は基質との結合力を低下させ、HNP に対する触媒活性を低下させるが、SM に対する触媒活性は強めるように寄与することが明らかになった。さらに、Asp156 には親水性基質の加水分解を抑制する働きがあることもわかった。

実験方法

第一章第一節に関する実験方法

1. ウシ腓臓由来 *pro*-PLA₂ と *active*-PLA₂ の精製

ウシ腓臓由来 *pro*-PLA₂ の精製は Dutilh らの方法³⁴⁾ を改良して行った。脂肪組織を切除したウシ腓臓をホモジネート後、酸処理と熱処理を行い、遠心分離により得た上澄について、プロテアーゼ阻害剤 (*p*-amidinophenyl)methanesulfonylfluoride (*p*-APMSF)⁹²⁾ 存在下で硫酸分画を行った。得られた画分は、CM-cellulose (Whatman, CM-52) カラムによるクロマトグラフィーで分画した後、Mono Q (Pharmacia) カラムを用いるクロマトグラフィーにより *pro*-PLA₂ の精製標品を得た。

次に、*pro*-PLA₂ 精製標品に、10 mM CaCl₂ 存在下、4℃、pH 8.0 の条件で、*pro*-PLA₂ の 0.1 (w/w) % 量の TPCK 処理 trypsin (Sigma) を加えることにより限定加水分解を行い、N-末端ペプチドを除去して *active*-PLA₂ を得た⁹³⁾。反応の進行は pH-stat を用いて追跡した。反応液を 1% acetic acid に対して透析し、凍結乾燥後、Mono Q カラムを用いるクロマトグラフィーにより *active*-PLA₂ の最終精製標品を得た。

精製標品は、等電点電気泳動、SDS-PAGE、アミノ酸組成分析、N-末端 14 残基のアミノ酸配列の決定により、単一であることを確認した。

active-PLA₂ と *pro*-PLA₂ の濃度は、280 nm における吸光度を測定することにより決定した。なお、それぞれの酵素の吸光係数 $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ は 11.7 および 12.3 とし、分子吸光係数 ϵ はともに $1.70 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ とした^{34, 94)}。

2. 円二色性 (CD) の測定

遠紫外部の CD スペクトルは、25℃、イオン強度 0.2 の条件下、日本分光 J-500A spectropolarimeter を用いて測定した。装置の較正は *d*-camphorsulfonate (片山化学) を用いて行った⁹⁶⁾。測定には光路長 0.1 または 0.2 cm の石英角型セルを用い、酵素濃度は 0.04 - 0.05 mg/ml とした。平均残基モル楕円率 $[\theta]$ は次式を用いて計算した： $[\theta] = (100 \times \theta) / (l - c)$ 。ここで、 θ は楕円率の実測値 (degree)、 c は残基モル濃度 (mol/l)、 l はセルの光路長 (cm) である。また、平均残基分子量は 123 とした。緩衝液成分 MES と CAPS は同仁から、acetic acid, TES, および CHES はナカライテスクから購入し、これらの濃度は 20 mM とした。イオン強度は NaCl (マナック) を用いて 0.2 に調整した。CD 測定後の溶液の pH は、Radiometer (Copenhagen) PHM 82 standard pH meter を用いて 25℃で測定した。

3. PLA₂ と BPB との反応

PLA₂ と BPB との反応は 25℃、イオン強度 0.2 の条件下で行った。*active*-PLA₂ の場合は酵素の残存活性を、*pro*-PLA₂ の場合は未修飾の His 残基の数をアミノ酸組成分析で決定することにより反応を追跡した。

酵素溶液 2.5 ml を激しく攪拌しつつ BPB (同仁) 溶液 25 μ l を注入して反応を開始した。反応液中の酵素濃度は $5.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ とした。少量の反応液を一定時間間隔で抜き取り、

active-PLA₂ の場合は氷冷した 2 mM Triton X-100 を含む 60 mM HCl 溶液 200 μ l に、*pro*-PLA₂ の場合は、氷冷した 24 mM CaCl₂ を含む 60 mM formic acid 200 μ l に加えて反応を停止し、それぞれについて、酵素活性の測定またはアミノ酸組成分析を行った。BPB 反応液中の緩衝液成分として、MES と CAPS (同仁)、acetic acid, PIPES, TES, Tris, および CHES (ナカライテスク) を用い、濃度は 20 mM とした。イオン強度は NaCl を用いて 0.2 に調整した。

PLA₂ の残存活性は pH-stat (Radiometer PHM 82 standard pH meter, TTT 80 titrator, および ABU 80 autoburette) を用いて pH 8.0 で測定した。反応液に Tris が含まれている場合は、Tris による緩衝作用を避けるために pH 7.0 で測定した。基質溶液には、NaCl でイオン強度を 0.2 に調整した 2 mM 1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (diC₁₂PC) (Sigma) の Triton X-100 (Sigma) との混合ミセル (1:5) 溶液または cholic acid (Sigma) との混合ミセル (1:5) 溶液を用いた。

未修飾の His 残基の数は、日立 L-8500 amino acid analyzer を用いて決定した。BPB との反応液を 1% acetic acid で平衡化した NAP-5 Sephadex G-25 カラム (Pharmacia) を用いて脱塩後、0.2% phenol を含む 5.7 M HCl 存在下、110℃、24 時間反応させて酸加水分解し、アミノ酸組成の分析を行った。

4. 蛍光スペクトルの測定

PLA₂ の Trp 残基に由来する蛍光スペクトルは、25℃、イオン強度 0.2 の条件下、日立 Model 850 fluorescence spectrophotometer を用いて測定した。酵素濃度は $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ とした。励起波長は 290 nm、励起光側のスリット幅は 1.5 nm、蛍光側のスリット幅は 10 nm とした。装置による蛍光強度の時間的変動は、試料溶液の蛍光を測定する前後に、二次標準の *N*-acetyl-*L*-tryptophanamide (Sigma) 溶液の蛍光を測定して補正した。

緩衝液成分には MES と CAPS (同仁)、acetic acid, PIPES, TES, Tris および CHES (ナカライテスク) を用い、濃度は 20 mM とした。イオン強度は NaCl を用いて 0.2 に調整した。

5. 短鎖レシチンの合成

1,2-dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (diC₆PC) と 1,2-diheptanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (diC₇PC) は、Robeles と van den Berg の方法⁹⁶⁾ に従い、*L*- α -glycero-phosphocholine を *n*-caproic acid anhydride または *n*-enanthic acid anhydride (東京化成) を用いてアシル化することにより合成した。

L- α -glycerophosphocholine の原料には、卵黄 lecithin (キューピー) からシリカゲル (Merk, silicagel 60 mesh 230-400) カラムクロマトグラフィーにより精製した phosphatidylcholine (PC) を用いた⁹⁷⁾。脱アシル化剤には 1 M tetra-*n*-butyl-ammonium hydroxide (Aldrich) の methanol 溶液を用いた。合成標品は Silicagel 60 と Unisil (Clarkson, 100-200mesh) を用いるカラムクロマトグラフィーにより精製した。

合成最終標品は、chloroform : methanol : 水 [65:25:4 (v/v)] を展開溶媒とする Silicagel 60 plate (Merk) を用いる薄層クロマトグラフィーにより、単一であることを確認した。

6. 基質の加水分解反応の速度の測定

diC₆PC と diC₇PC の加水分解反応は、25℃、イオン強度 0.2 の条件下、pH-stat を用いて追跡した。

一定濃度の CaCl₂ (Merck) を含む基質溶液 1 ml の pH を 10 mM NaOH で目的の値に設定し、窒素気流下でその pH を維持しながら、自然水解により生じる脂肪酸を 10 mM NaOH で滴定した。次に、この溶液に酵素溶液 5 - 25 μl を加えて反応を開始し、酵素反応により生じる脂肪酸を 10 mM NaOH で滴定した。経時的に記録した NaOH の滴定量は、自然水解による滴定量を差し引くことにより補正した。また、pH 6.5 以下の領域では、脂肪酸は完全に解離しないので、滴定量は、脂肪酸の解離度 α [$= 1/(1+10^{pK-pH})$] を用いて補正した。*n*-caproic acid と *n*-enanthic acid の p*K* 値は²³⁾ NaOH 溶液を用いる酸塩基滴定により、それぞれ 4.8 と 4.85 と決定した。

第一章第二節に関する実験方法

1. 酵素溶液の調製

コブラ (*N. naja atra*)、マムシ (*A. halys blomhoffii*)、ハブ (*T. flavoviridis*)、およびクサリヘビ (*V. russelli russelli*) 毒由来 PLA₂ はそれぞれ、Lo と Chang^{76, 98)}、河内ら⁹⁹⁾、三宅ら²⁰⁾、および井上ら^{*}) の方法に従って精製した。ウミヘビ (*P. australis*) 毒由来 PLA₂ (Pa-12A)¹⁰⁰⁾ は東北大学 高崎博士より供与された。ウシ膵臓由来 PLA₂ の精製法は「第一章第一節に関する実験方法」に示した。

精製 PLA₂ の凍結乾燥標品は、4 mM HCl を含む 0.1 または 0.2 M NaCl 溶液に溶解後、Sephadex G-75 または G-100 を用いるゲル濾過クロマトグラフィーにより溶媒を 0.1 または 0.2 M NaCl 溶液で置換し、少量の会合タンパク質を除去して、PLA₂ のストック溶液とし、4℃で保存した。

PLA₂ のストック溶液の濃度は紫外吸収スペクトルを測定することにより決定した。それぞれの PLA₂ の分子吸光係数 ϵ には以下の値を用いた。

<i>N. naja atra</i> PLA ₂	$2.93 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ at 278 nm ¹⁶⁾
<i>A. halys blomhoffii</i> PLA ₂	$2.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ at 279 nm ⁷⁴⁾
<i>T. flavoviridis</i> PLA ₂	$3.52 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ at 280 nm ²⁰⁾
<i>P. australis</i> PLA ₂	$2.01 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ at 280 nm ¹⁰¹⁾
<i>V. russelli russelli</i> PLA ₂	$1.72 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ at 280 nm ¹⁰¹⁾
Bovine pancreatic PLA ₂	$1.70 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ at 278 nm ^{34, 94)}

2. 基質アナログの合成

nor-leucine の光学異性体またはそのラセミ体を出発物質として合成された 2-dodecanoylamino-1-hexanolphosphoglycol (amide-PG) と 2-dodecanoylamino-1-hexanol-phosphocholine (amide-PC)¹⁰²⁾、glycidol の光学異性体を出発物質として合成された 3-dodecanoyl-4-phosphatidylcholinehydroxymethyl-2-oxazolidinone (oxazolidinone-PC)¹⁰³⁾ は関西学院大学 勝村教授より供与された。合成品の最終精製は、Cosmosil 5C18 カラム (ナカライテスク)、acetonitrile の 30 から 100 %の直線濃度勾配を用いる逆相 HPLC により行った。精製標品は、methanol と水 [4:4 (v/v)] を展開溶媒とする RP-8 high-performance TLC plate (Merk) を用いる薄層クロマトグラフィーにより単一であることを確認した。

これらの基質アナログのストック溶液の濃度は、inductively coupled plasma (ICP) atomic emission spectrometer (ICPS-1000V, 島津) を用いて、リンの定量をすることにより決定した。

3. 基質の加水分解反応の速度の測定

酵素活性および基質アナログによる酵素活性の阻害は、第一章第一節の方法と同様に、基質アナログの存在下または非存在下、種々の濃度の Ca²⁺ を含む基質溶液に PLA₂ を加え、

^{*}) Inoue, S., *et al.*, unpublished data

pH-stat 法により測定した。それぞれの PLA₂ の実験は、以下に示すイオン強度と pH で行った。

<i>N. naja atra</i> PLA ₂	pH 8.2, イオン強度 0.1
<i>A. halys blomhoffii</i> PLA ₂	pH 8.2, イオン強度 0.1
<i>T. flavoviridis</i> PLA ₂	pH 8.0, イオン強度 0.2
<i>P. australis</i> PLA ₂	pH 7.5, イオン強度 0.1
<i>V. russelli russelli</i> PLA ₂	pH 8.0, イオン強度 0.2
Bovine pancreatic PLA ₂	pH 7.5, イオン強度 0.2

第一章第三節に関する実験方法

1. 実験材料

ウシ膵臓由来 PLA₂ は第一章第一節の実験方法に従って、ヘビ毒由来 PLA₂ は第一章第二節の実験方法に従って精製した。ブタ膵臓由来 PLA₂ は Boehringer Mannheim から購入し、Mono Q カラム (Pharmacia) を用いてさらに精製した。ブタ膵臓由来 PLA₂ の濃度は 280 nm における分子吸光係数 $\epsilon = 1.82 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ に基づいて決定した¹⁰⁴⁾。

以前に報告した方法⁶²⁾ で合成されたモノアライドのアナログ 1-(2,5-dihydro-2-hydroxy-5-oxo-3-furanyl)-8,12-dimethyl-4-formyl-3,7,11-tridecatrienol (MLD-analog) は関西学院大学 勝村教授より供与された。短鎖レシチン diC₆PC は第一章第一節の実験方法、*n*-dodecylphosphocholine (*n*-C₁₂PC) は以前に報告した方法⁷⁶⁾ により合成した。1,2-dilauroyl-*sn*-glycerophosphocholine (diC₁₂PC), Triton X-100, および cholic acid は Sigma から購入した。

2. MLD-analog による PLA₂ の不活性化反応

MLD-analog による PLA₂ の不活性化反応は、pH 8.0, 40℃, イオン強度 0.2 の条件下、50 mM Tris-HCl 緩衝液に溶解した PLA₂ 溶液に MLD-analog の dioxane 溶液を添加することにより開始した。一定時間後、反応液の一部を抜き取って基質溶液に加え、pH-stat 法により直ちに残存 PLA₂ 活性を測定した。また、反応液の一部は 1% acetic acid で平衡化した NAP-5 Sephadex G-25 column (Pharmacia) を用いて直ちに脱塩し、アミノ酸組成分析を行った。対照実験には MLD-analog を含まない dioxane 溶液を用いた。反応液中の PLA₂, MLD-analog, および dioxane の最終濃度はそれぞれ 4 μM, 0.4 mM, および 8.0 % とした。なお、不活性化反応におよぼすミセル状 *n*-C₁₂PC の影響を調べる実験においては、反応溶液に 10 mM *n*-C₁₂PC と 10 mM Ca²⁺ を加えた。

3. 酵素活性の測定

PLA₂ の酵素活性は、物理化学的状态の異なる 3 種類の基質を用い、10 mM CaCl₂ 存在下、25℃, pH 7.0, イオン強度 0.2 の条件下で、pH-stat 法により測定した。非イオン性のミセル状基質には 1 mM diC₁₂PC と 5 mM Triton X-100 の混合ミセル、陰イオン性のミセル状基質には 1 mM diC₁₂PC と 5 mM cholic acid の混合ミセル、単分子分散状基質には 4 mM diC₆PC を用いた。

4. MLD-analog により化学修飾されたウシ膵臓由来 PLA₂ の大量調製

ウシ膵臓由来 PLA₂ 1.5 mg を 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 2.5 ml に溶解し、MLD-analog の dioxane 溶液を最終濃度が 0.4 mM になるように加えて反応を開始した。反応液は、40℃で 20 分間インキュベーション後、直ちに 50 mM acetic acid 緩衝液 (pH 5.0) で平衡化した Sephadex G-25 column (1.6 cm × 23 cm) に添加し、溶出画分は 8M urea を含む同緩衝液に対して 24 時間透析した。得られた溶液は、透析に用いた緩衝液で平衡化した Mono S column (Pharmacia) に添加し、吸着タンパク質を 0 から 0.1 M の NaCl の直線濃度勾配を用いて溶出することにより、修飾酵素と未修飾酵素を分離した。

5. MLD-analog により修飾された酵素および未修飾酵素のペプチド断片化

修飾および未修飾ウシ腓臓由来 PLA₂ の S-pyridylethyl 化 (PE-) 誘導体の調製は, Cavins と Friedman らの方法¹⁰⁵⁾ に基づいて行った. PLA₂ 約 0.2 mg を 6 M guanidine-HCl 0.3 ml と 10 mM EDTA を含む 0.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に溶解し, dithiothreitol 0.09 mg を添加して 60℃ で 2 時間処理した. この溶液に 4-vinylpyridine 2 μl を加えて室温で 3 時間反応後, 1% acetic acid に対して透析することにより脱塩し, 凍結乾燥した. 得られた PE-誘導体は, *Achromobacter lyticus* 由来 lysyl endopeptidase (和光純薬) を用いて酵素消化した. 消化は, 4 M urea を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 9.0) 中, 酵素と基質タンパク質の比を 1:100 (w/w) として 37℃ で 15 時間反応させることにより行った. 得られたペプチド断片の分離は, Capcell Pak C18 (資生堂) を用いる逆相 HPLC により, 0.1 % trifluoroacetic acid を含む acetonitrile の 0 から 80 % の直線濃度勾配を用いて行った.

6. アミノ酸組成分析

タンパク質とペプチドの酸加水分解は, 0.2 % phenol を含む 5.7 M HCl の存在下, 真空にした封管中で, 110℃, 24 時間反応することにより行った. 加水分解後の試料のアミノ酸組成分析には日立 L-8500 amino acid analyzer を用いた.

7. アミノ酸配列の決定

PE-誘導体ペプチドのアミノ酸配列は, 120A phenylthiohydantoin analyzer を装備した Applied Biosystems model 477A protein sequencer を用いて決定した.

第二章に関する実験方法

1. 実験材料

ウシ脳由来 sphingomyelin (SM), 2-hexadecanoylamino-4-nitrophenylphosphocholine (HNP), および Triton X-100 は Sigma から購入した. 高純度の MgCl₂·6H₂O と NaCl はそれぞれ和光純薬とマナックから購入した. 以前に報告した方法⁸⁷⁾ に従って合成された短鎖 SM アナログ (*N*-hexanoyl-C₁₀-sphingosylphosphocholine と *N*-hexanoyl-C₁₀-dihydrosphingosylphosphocholine) は関西学院大学 勝村教授より供与された. これらのアナログのストック溶液の濃度は, Fiske と Sabbarow の方法¹⁰⁶⁾ に従ってリンの定量を行うことにより決定した.

2. SMase の調製

Bacillus cereus 菌由来 SMase は富田らの方法¹⁰⁷⁾ に従って精製, または, ヒゲタ醤油から購入した. 精製標品と市販品の純度は, SDS-PAGE, アミノ酸組成分析, N 末端アミノ酸配列の決定, 逆相 HPLC により確認した. さらに, 両標品の酵素活性は同じであり, それらをピリジリエチル化後, lysyl endopeptidase 消化して得たペプチド断片の逆相 HPLC の溶出パターンも同じであることを確認した.

Bacillus brevis 47 を宿主とする SMase の変異体酵素 (D126G と D156G) の組換え体⁸³⁾ は名古屋市立大学 池沢教授より供与された. それぞれの変異酵素は以前に報告した方法で精製した. SMase とその変異体の最終精製標品については, 0.2 M NaCl で平衡化した Sephadex G-100 カラムを用いて会合タンパク質を除去し, 溶媒を 0.2 M NaCl に置換して, ストック溶液とした.

SMase のストック溶液の濃度決定は紫外吸収スペクトルを測定することにより行った. SMase とその変異体の分子吸光係数 ϵ は, Tyr と Trp の含量¹⁰⁸⁾ および, それぞれの 280 nm における分子吸光係数¹⁰¹⁾ 1.4×10^3 および $5.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いて計算し, $5.82 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ とした.

3. 蛍光スペクトルの測定

蛍光スペクトルは第一章第一節の実験方法と同様の方法で測定した. 酵素濃度は $1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ とした.

4. SMase に対する Mg²⁺ の結合量の決定

SMase に対する Mg²⁺ の結合量の決定は, 20 mM MES 緩衝液 (pH 6.0) を用い, 25℃, イオン強度 0.2 の条件下, 透析平衡法により行った. Mg²⁺ を含む酵素溶液 100 μl と, 酵素を含まない Mg²⁺ 溶液 100 μl を透析膜 (Spectra/Por Spectrum. Molecular weight cut-off, 12-14 kDa) により隔て, 25℃ で 24 時間放置後, 両溶液中の Mg²⁺ 濃度を atomic absorption/flame emission spectrophotometer AA-670 (島津) を用いて測定した. なお, 既知濃度の Mg²⁺ 標準溶液は和光純薬から購入した.

5. CD スペクトルの測定

CD スペクトルは，第一章第一節の実験方法と同様の方法で 37℃で測定した．残基モル楕円率 $[\theta]$ の計算には，平均残基分子量 112 を用いた．

6. 酵素活性の測定

SMase による HNP の加水分解反応は，Gal らの方法¹⁰⁹⁾に従い 37℃，イオン強度 0.2 の条件下で行った．反応は，一定濃度の Mg^{2+} を含む基質溶液 100 μ l に酵素溶液 5 - 10 μ l を添加することにより開始した．一定時間後，0.1 M glycine-NaOH 緩衝液 (pH 10.5) 3 ml を加えて反応を停止し，410 nm における吸光度を測定した．酵素活性の計算には，生成物である 2'-hydroxy-5'-nitrohecadecananilide の分子吸光係数 $1.49 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いた．

基質として SM と Triton X-100 との混合ミセルおよび短鎖の SM アナログを用いた場合，第一章第一節の実験方法と同様に，pH-stat 法により酵素活性の測定を行った．この場合，pH 7 以下の領域においては，遊離した phosphocholine は完全には解離しないので，滴定量は phosphocholine の解離度 α $[= 1/(1+10^{pK-pH})]$ を用いて真の値に補正した．ここで，phosphocholine の pK 値¹¹⁰⁾は 5.72 とした．

論文目録

本論文の内容は以下の雑誌に公表した

1. Shinobu Fujii, Toshihiko Inoue, Seiji Inoue, and Kiyoshi Ikeda
Kinetics of the Hydrolysis of Monodispersed Dihexanoylphosphatidylcholine Catalyzed by Bovine Pancreatic Phospholipase A₂: Roles of Ca²⁺ Binding and Ionizations of Amino Acid Residues in the Active Site.
J. Biochem. **110** (6) 1008-1015 (1991)
2. Shuji Hada, Shinobu Fujii, Seiji Inoue, Kiyoshi Ikeda, and Keizo Teshima
Hydrolysis of Micellar Diheptanoylphosphatidylcholine Catalyzed by Bovine Pancreatic Phospholipase A₂: Kinetic Characterization of Group I and II Enzymes.
J. Biochem. **113** (1) 13-18 (1993)
3. Shinobu Fujii, Takeshi Tani, Shuji Hada, Seiji Inoue, Kiyoshi Ikeda, Seiji Iwama, Shigeo Katsumura, Yuji Samejima, Tamotsu Omori-Satoh, Chikahisa Takasaki, and Kyozo Hayashi
Role of Ca²⁺ in the Binding of Phospholipase A₂ with a Monomeric Substrate and with Its Amide-Type Analog.
J. Biochem. **116** (4) 870-876 (1994)
4. Takeshi Tani, Shinobu Fujii, Seiji Inoue, Kiyoshi Ikeda, Seiji Iwama, Takeshi Matsuda, Shigeo Katsumura, Yuji Samejima and Kyozo Hayashi
Binding Mode of Phospholipase A₂ with a New Type of Phospholipid Analog Having an Oxazolidinone Ring.
J. Biochem. **117** (1) 176-182 (1995)
5. Shinobu Fujii, Yasuhiro Tahara, Misao Toyomoto, Shuji Hada, Hiroko Nishimura, Seiji Inoue, Kiyoshi Ikeda, Yasuhiro Inagaki, Shigeo Katsumura, Yuji Samejima, Tamotsu Omori-Satoh, Chikahisa Takasaki and Kyozo Hayashi
Chemical Modification and Inactivation of Phospholipase A₂ by a Manoalide Analogue.
Biochem. J. **308** 297-304 (1995)
6. Shinobu Fujii, Miki Meida, Takeshi Tani, Seiji Inoue, Seiji Iwama, Shigeo Katsumura and Kiyoshi Ikeda
pH Dependence of the Reaction Rate of *p*-Bromophenacyl Bromide and of the Binding Constants of Ca²⁺ and an Amide-Type Substrate Analog to Bovine Pancreatic Phospholipase A₂.
Arch. Biochem. Biophys. **354** (1) 73-82 (1998)
7. Shinobu Fujii, Bunpei Inoue, Hiroki Yamamoto, Kenji Ogata, Tomihiro Shinki, Seiji Inoue, Masahiro Tomita, Hiro-omi Tamura, Kikuo Tsukamoto, Hiroh Ikezawa and Kiyoshi Ikeda
Mg²⁺ Binding and Catalytic Function of Sphingomyelinase from *Bacillus cereus*.
J. Biochem **124** (6) 1178-1187 (1998)
8. Shinobu Fujii, Kenji Ogata, Bunpei Inoue, Seiji Inoue, Masahiro Murakami, Seiji Iwama, Shigeo Katsumura, Masahiro Tomita, Hiro-omi Tamura, Kikuo Tsukamoto, Hiroh Ikezawa and Kiyoshi Ikeda
Roles of Asp 126 and Asp 156 in the Enzyme Function of Sphingomyelinase from *Bacillus cereus*.
J. Biochem. **126** (1) 90-97 (1999)

謝辞

本研究は、大阪薬科大学 第一生化学教室において行なわれたものであり、終始ご指導いただいた大阪薬科大学 池田 潔 教授に心から感謝します。

また、本論文を作成するにあたり、種々のヘビ毒を提供していただくとともに有益なご助言をいただいた岐阜薬科大学 林 恭三 名誉教授、種々の基質アナログとマノアライドアナログを提供していただいた関西学院大学 勝村 成雄 教授、岩間 聖司 博士、SMase 精製のための *B. cereus* 菌株と SMase の組換え体を提供していただくとともに有益なご助言をいただいた名古屋市立大学 池沢 宏郎 教授（現大阪薬科大学招聘教授）、塚本 喜久雄 講師、田村 悦臣 講師（現共立薬科大学）富田 昌弘 助教授（現三重大学）、有益なご助言をいただいた京都大学 川嵯 敏祐 教授に感謝します。

マムシ毒を提供していただいた星薬科大学 鮫島 勇次 教授、ハブ毒を提供していただいた元国立予防衛生研究所 佐藤 保 博士、ウミヘビ毒由来 PLA₂ を提供していただいた東北大学 高崎 親久 博士、短鎖リン脂質の合成をご指導いただいた日本商事株式会社（現アズエル）、PLA₂ の高次構造のコンピューターグラフィックスに関してご指導いただいた大阪薬科大学 石田 寿昌 教授、大石 宏文 博士、ICP によるリンの定量法をご指導いただいた大阪薬科大学 藤田 芳一 助教授、原子吸光法による Mg²⁺ の定量法をご指導いただいた大阪薬科大学 西野 隆雄 講師に感謝します。

種々の実験にご協力いただいた大阪薬科大学 第一生化学教室 銘田 美樹 氏、奥村 幸治 氏、羽田 修二 氏、西村 裕子 氏、谷 健 氏、田原 康弘 氏、井上 文平 氏、山本 博紀 氏、緒方 賢治 氏、同第二生化学教室 豊元 操 助手、数々のご助言を賜りました大阪薬科大学 第一生化学教室 井上 晴嗣 助教授ならびに、当教室の卒業生に感謝します。

引用文献

- 1) Prescott, S. M. (1997) A thematic series on phospholipases. *J. Biol. Chem.* **272**, 15043
- 2) Rhee, S. G. and Bae, Y. S. (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C Isozymes. *J. Biol. Chem.* **272**, 15045-15048
- 3) Exton, J. H. (1997) New developments in phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **272**, 15579-15582
- 4) Balsinde, J., Balboa, M. A., Insel, P. A. and Dennis, E. A. (1999) Regulation and inhibition of phospholipase A₂. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 175-189
- 5) Balsinde, J. and Dennis, E. A. (1997) Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* **272**, 16069-16072
- 6) Leslie, C. C. (1997) Properties and regulation of cytosolic phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* **272**, 16709-16712
- 7) Tischfield, J. A. (1997) A reassessment of the low molecular weight phospholipase A₂ gene family in mammals. *J. Biol. Chem.* **272**, 17247-17250
- 8) Stafforini, D. M., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A. and Prescott, S. M. (1997) Platelet-activating factor acetylhydrolases. *J. Biol. Chem.* **272**, 17895-17898
- 9) Hannun, Y. A. (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **274**, 1855-1859
- 10) Levade, T. and Jaffrezou, J. P. (1999) Signaling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim. Biophys. Acta* **1438**, 1-17
- 11) Kolesnick, R. N. and Kronke, M. (1998) Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 643-665
- 12) Schuchman, E. H. and Desnick, R. J. (1995) Niemann-pick disease types A and B: Acid sphingomyelinase deficiencies. *in the Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease Seventh Edition* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. and Valle, D., eds.) Vol. II, pp. 2601-2624, McGraw-Hill, New York
- 13) Dennis, E. A. (1997) The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 1-2
- 14) Heinrikson, R. L., Krueger, E. T. and Keim, P. S. (1977) Amino acid sequence of phospholipase A₂-α from the venom of *Crotalus adamanteus*. A new classification of phospholipases A₂ based upon structural determinants. *J. Biol. Chem.* **252**, 4913-4921
- 15) Scott, D. L. and Sigler, P. B. (1994) Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A₂. *Adv. Protein Chem* **45**, 53-88
- 16) Teshima, K., Ikeda, K., Hamaguchi, K. and Hayashi, K. (1981) pH dependence of the binding constant of Ca²⁺ to cobra venom phospholipases A₂. *J. Biochem.* **89**, 13-20
- 17) Ikeda, K., Sano, S. and Samejima, Y. (1981) pH dependence of the binding constant of Ca²⁺ to the phospholipase A₂ of *A. halys blomhoffii*. Participation of ionizable groups with pK values of 5.16, 6.45, and 7.30. *J. Biochem.* **90**, 1125-1130
- 18) Haruki, H., Teshima, K., Samejima, Y., Kawauchi, S. and Ikeda K (1986) Interaction of monodispersed and micellar phospholipids with an *Agkistrodon halys blomhoffii* phospholipase A₂, in which the α-amino group had been modified to an α-keto group. *J. Biochem.* **99**, 99-109
- 19) Teshima, K., Samejima, Y., Kawauchi, S., Ikeda, K. and Hayashi, K. (1984) Bindings of Ca²⁺ and substrate analogs to a cobra venom phospholipase A₂ in which the α-amino group is modified to an α-keto group. *J. Biochem.* **96**, 1903-1913
- 20) Miyake, T., Inoue, S., Ikeda, K., Teshima, K., Samejima, Y. and Omori-Satoh, T. (1989) pH dependence of the reaction rate of His 48 with *p*-bromophenacyl bromide and of the binding constant to Ca²⁺ of the monomeric forms of intact and α-NH₂ modified phospholipases A₂ from *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biochem.* **105**, 565-572
- 21) Teshima, K., Ikeda, K., Hamaguchi, K. and Hayashi, K. (1982) Participation of an ionizable

- group with pK 8.55 in the reaction of *p*-bromophenacyl bromide with His 48 of cobra venom phospholipases A₂. *J. Biochem.* **91**, 1777-1788
- 22) Teshima, K., Samejima, Y., Kawauchi, S., Ikeda, K. and Hayashi, K. (1985) Kinetics of the hydrolysis of monodispersed dihexanoyllecithin catalyzed by a cobra (*Naja naja atra*) venom phospholipase A₂. *J. Biochem.* **98**, 1509-1517
 - 23) Teshima, K., Kitagawa, Y., Samejima, Y., Kawauchi, S. and Ikeda, K. (1986) Kinetics of the hydrolysis of monodispersed dihexanoyllecithin catalyzed by the phospholipase A₂ from *Agkistrodon halys blomhoffii* venom. *J. Biochem.* **100**, 1655-1662
 - 24) Teshima, K., Ikeda, K., Miyake, T., Imamura, M., Inoue, S., Samejima, Y., Kawauchi, S. and Omori-Satoh, T. (1989) Interactions of monodispersed and micellar substrates with a phospholipase A₂ from *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biochem.* **105**, 1044-1051
 - 25) Teshima, K., Kitagawa, Y., Samejima, Y., Kawauchi, S., Fujii, S., Ikeda, K., Hayashi, K. and Omori-Satoh, T. (1989) Role of Ca²⁺ in the substrate binding and catalytic functions of snake venom phospholipases A₂. *J. Biochem.* **106**, 518-527
 - 26) Teshima, K., Samejima, Y., Kawauchi, S. and Ikeda, K. (1990) Kinetics of the hydrolysis of mixed micelles of dipalmitoyllecithin with triton X-100 catalyzed by a phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. *J. Biochem.* **108**, 21-27
 - 27) Nishimura, H., Inoue, S., Ikeda, K., Teshima, K., Samejima, Y., Omori-Satoh, T. and Hayashi, K. (1992) Kinetics of the hydrolysis of micellar substrates catalyzed by snake venom phospholipases A₂. *J. Biochem.* **111**, 210-218
 - 28) Nieuwenhuizen, W., Kunze, H. and de Haas, G. H. (1974) Phospholipase A₂ (phosphatide acylhydrolase, EC 3.1.1.4) from porcine pancreas. *Methods Enzymol.* **32B**, 147-154
 - 29) Ishimaru, K., Kihara, H. and Ohno, M. (1980) Purification and properties of phospholipase A from venom of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake). *J. Biochem.* **88**, 443-451
 - 30) Volwerk, J. J., Pieterse, W. A. and de Haas, G. H. (1974) Histidine at the active site of phospholipase A₂. *Biochemistry* **13**, 1446-1454
 - 31) Roberts, M. F., Deems, R. A., Mincey, T. C. and Dennis, E. A. (1977) Chemical modification of the histidine residue in phospholipase A₂ (*Naja naja naja*). A case of half-site reactivity. *J. Biol. Chem.* **252**, 2405-2411
 - 32) Verheij, H. M., Volwerk, J. J., Jansen, E. H., Puyk, W. C., Dijkstra, B. W., Drenth, J. and de Haas, G. H. (1980) Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. *Biochemistry* **19**, 743-750
 - 33) Dijkstra, B. W., Drenth, J., Kalk, K. H. and van der Maelen, P. J. (1978) Three-dimensional structure and disulfide bond connections in bovine pancreatic phospholipase A₂. *J. Mol. Biol.* **124**, 53-60
 - 34) Dutilh, C. E., van Doren, P. J., Verheul, F. E. A. M. and de Haas, G. H. (1975) Isolation and properties of pro-phospholipase A₂ from ox and sheep pancreas. *Eur. J. Biochem.* **53**, 91-97
 - 35) Verheij, H. M., Slotboom, A. J. and de Haas, G. H. (1981) Structure and function of phospholipase A₂. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **91**, 91-203
 - 36) Tausk, R. J. M., Karmiggelt, J., Oudshoorn, C. and Overbeek, J. Th. G. (1974) Physical chemical studies of short chain lecithin homologs. I. Influence of the chain length of the fatty acid ester and of electrolytes on the critical micelle concentration. *Biophys. Chem.* **1**, 175-183
 - 37) Pieterse, W. A., Vidal, J. C., Volwerk, J. J. and de Haas, G. H. (1974) Zymogen-catalyzed hydrolysis of monomeric substrates and the presence of a recognition site for lipid-water interfaces in phospholipase A₂. *Biochemistry* **13**, 1455-1460
 - 38) Wells, M. A. (1974) The mechanism of interfacial activation of phospholipase A₂. *Biochemistry* **13**, 2248-2257
 - 39) Aguiar, A., de Haas, G. H., Jansen, E. H., Slotboom, A. J. and Williams, R. J. (1979) Proton-nuclear-magnetic-resonance/pH-titration studies of the histidines of pancreatic phospholipase A₂. *Eur. J. Biochem.* **100**, 511-518
 - 40) Dijkstra, B. W., Kalk, K. H., Hol, W. G. J. and Drenth, J. (1981) Structure of bovine pancreatic phospholipase A₂ at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **147**, 97-123
 - 41) Dijkstra, B. W., Renetseder, R., Kalk, K. H., Hol, W. G. J. and Drenth, J. (1983) Structure of porcine pancreatic phospholipase A₂ at 2.6 Å resolution and comparison with bovine phospholipase A₂. *J. Mol. Biol.* **168**, 163-179
 - 42) Bundi, A. and Wuthrich, K. (1979) Proton NMR parameters of the common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides H-Gly-Gly-X-L-Ala-OH. *Biopolymers* **18**, 286-297
 - 43) Ikeda, K. and Hayashi, K. (1983) pH-dependence of the binding constant of Ca²⁺ to β-bungarotoxin from *Bungarus multicinctus* venom. *J. Biochem.* **93**, 1343-1351
 - 44) Volwerk, J. J., Dedieu, A. G. R., Verheij, H. M., Dijkman, R. and de Haas, G. H. (1979) Hydrolysis of monomeric substrates by porcine pancreatic (pro)phospholipase A₂. The use of a spectrophotometric assay. *Recl. Trav. Chem. Pays-Bas* **98**, 214-220
 - 45) de Haas, G. H., Bensen, P. P. M., Pieterse, W. A. and van Deenen, L. L. M. (1971) Studies on phospholipase A and its zymogen from porcine pancreas. 3. Action of the enzyme on short-chain lecithins. *Biochim. Biophys. Acta.* **239**, 252-266
 - 46) Renetseder, R., Brunie, S., Dijkstra, B. W., Drenth, J. and Sigler, P. B. (1985) A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. *J. Biol. Chem.* **260**, 11627-11634
 - 47) Thunnissen, M. M. G. M., AB, E., Kalk, K. H., Drenth, J., Dijkstra, B. W., Kuipers, O. P., Dijkman, R., de Haas, G. H. and Verheij, H. M. (1990) X-ray structure of phospholipase A₂ complexed with a substrate-derived inhibitor. *Nature* **347**, 689-691
 - 48) Danse, J. M., Gasparini, S. and Menez, A. (1997) Molecular Biology of Snake Venom Phospholipases A₂. in *Venom Phospholipase A₂ Enzyme: Structure, Function, and Mechanism* (Kini, R. M., eds) pp.29-71, John Wiley & Sons Ltd., England
 - 49) Takasaki, C., Yutani, F. and Kajiyashiki, T. (1990) Amino acid sequences of eight phospholipases A₂ from the venom of Australian king brown snake, *Pseudechis australis*. *Toxicon* **28**, 329-339
 - 50) Wells, M. A. (1972) A kinetic study of the phospholipase A₂ (*Crotalus adamanteus*) catalyzed hydrolysis of 1,2-dibutyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholine. *Biochemistry* **11**, 1030-1041
 - 51) de Haas, G. H., Dijkman, R., Ransac, S. and Verger, R. (1990) Competitive inhibition of lipolytic enzymes. IV. Structural details of acylamino phospholipid analogues important for the potent inhibitory effects on pancreatic phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta* **1046**, 249-257
 - 52) Rogers, J., Yu, B. Z. and Jain, M. K. (1992) Basis for the anomalous effect of competitive inhibitors on the kinetics of hydrolysis of short-chain phosphatidylcholines by phospholipase A₂. *Biochemistry* **31**, 6056-6062
 - 53) Yu, L. and Dennis, E. A. (1991) Critical role of a hydrogen bond in the interaction of phospholipase A₂ with transition-state and substrate analogues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9325-9329
 - 54) Scott, D. L., White, S. P., Browning, J. L., Rosa, J. J., Gelb, M. H. and Sigler, P. B. (1991) Structures of free and inhibited human secretory phospholipase A₂ from inflammatory exudate. *Science* **254**, 1007-1010
 - 55) Plesniak, L. A., Boegeman, S. C., Segelke, B. W. and Dennis, E. A. (1993) Interaction of phospholipase A₂ with thioether amide containing phospholipid analogues. *Biochemistry* **32**, 5009-5016
 - 56) Bennion, C., Connolly, S., Gensmantel, N. P., Hallam, C., Jackson, C. G., Primrose, W. U., Roberts, G. C. K., Robinson, D. H. and Slaich, P. K. (1992) Design and synthesis of some substrate analogue inhibitors of phospholipase A₂ and investigations by NMR and molecular modeling into the binding interactions in the enzyme-inhibitor complex. *J. Med. Chem.* **35**, 2939-2951
 - 57) Slaich, P. K., Primrose, W. U., Robinson, D. H., Wharton, C. W., White, A. J., Drabble, K. and Roberts, G. C. K. (1992) The binding of amide substrate analogues to phospholipase A₂.

- Studies by ^{13}C -nuclear-magnetic-resonance and infrared spectroscopy. *Biochem. J.* **288**, 167-173
- 58) de Silva, E. D. and Scheuer, P. J. (1980) Manoalide, an antibiotic sesterterpenoid from the marine sponge *Luffariella variabilis* (Polejaeff). *Tetrahedron Lett.* **21**, 1611-1614
 - 59) Jacobs, R. S., Culver, P., Langdon, R., O'Brien, T. and White, S. (1985) Some pharmacological observations on marine natural products. *Tetrahedron* **41**, 981-984
 - 60) Glaser, K. B. and Jacobs, R. S. (1986) Molecular pharmacology of manoalide. Inactivation of bee venom phospholipase A_2 . *Biochem. Pharmacol.* **35**, 449-453
 - 61) Lombardo, D. and Dennis, E. A. (1985) Cobra venom phospholipase A_2 inhibition by manoalide. A novel type of phospholipase inhibitor. *J. Biol. Chem.* **260**, 7234-7240
 - 62) Katsumura, S., Han, Q., Kadono, H., Fujiwara, S., Isoe, S., Fujii, S., Nishimura, H. and Ikeda, K. (1992) Phospholipase A_2 inhibition by manoalide: development of simple analogues and necessary functional groups for inhibition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2**, 1263-1266
 - 63) Bennett, C. F., Mong, S., Clarke, M. A., Kruse, L. I. and Crooke, S. T. (1987) Differential effects of manoalide on secreted and intracellular phospholipases. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 733-740
 - 64) Glaser, K. B., Vedvick, T. S. and Jacobs, R. S. (1988) Inactivation of phospholipase A_2 by manoalide. Localization of the manoalide binding site on bee venom phospholipase A_2 . *Biochem. Pharmacol.* **37**, 3639-3646
 - 65) Katsumura, S., Han, Q., Fujiwara, S., Isoe, S., Nishimura, H., Inoue, S. and Ikeda, K. (1992) Toward elucidation of the inhibition mechanism of phospholipase A_2 by manoalide: selectively modified amino acid residues by manoalide analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2**, 1267-1268
 - 66) Reynolds, L. J., Morgan, B. P., Hite, G. A., Mihelich, E. D. and Dennis, E. A. (1988) Phospholipase A_2 inhibition and modification by manoalogue. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5172-5177
 - 67) White, S. P., Scott, D. L., Otwinowski, Z., Gelb, M. H. and Sigler, P. B. (1990) Crystal structure of cobra-venom phospholipase A_2 in a complex with a transition-state analogue. *Science* **250**, 1560-1563
 - 68) Fremont, D. H., Anderson, D. H., Wilson, I. A., Dennis, E. A. and Xuong, N. H. (1993) Crystal structure of phospholipase A_2 from Indian cobra reveals a trimeric association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 342-346
 - 69) Scott, D. L., Otwinowski, Z., Gelb, M. H. and Sigler, P. B. (1990) Crystal structure of bee-venom phospholipase A_2 in a complex with a transition-state analogue. *Science* **250**, 1563-1566
 - 70) Volwerk, J. J., Jost, P. C., de Haas, G. H. and Griffith, O. H. (1986) Activation of porcine pancreatic phospholipase A_2 by the presence of negative charges at the lipid-water interface. *Biochemistry* **1986**, 1726-1733
 - 71) Tomoo, K., Ohishi, H., Ishida, T., Inoue, M., Ikeda, K., Aoki, Y. and Samejima, Y. (1989) Revised amino acid sequence, crystallization, and preliminary X-ray diffraction analysis of acidic phospholipase A_2 from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. *J. Biol. Chem.* **264**, 3636-3638
 - 72) Mohri, N., Tanaka, S., Miyajima, T., Kihara, H. and Ohno, M. (1986) Identification of the tryptophan residue located in the calcium binding site of *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A_2 . *J. Biochem* **100**, 883-893
 - 73) de Araujo, P. S., Rosseneu, M. Y., Kremer, J. M., van Zoelen, E. J. and de Haas, G. H. (1979) Structure and thermodynamic properties of the complexes between phospholipase A_2 and lipid micelles. *Biochemistry* **18**, 580-586
 - 74) Ikeda, K., Sano, S., Teshima, K. and Samejima, Y. (1984) pH dependence of the binding constant of a phospholipase A_2 from *Agkistrodon halys blomhoffii* venom to micelles of *n*-hexadecylphosphorylcholine. *J. Biochem.* **96**, 1427-1436
 - 75) Teshima, K., Ikeda, K., Hamaguchi, K. and Hayashi, K. (1983) Bindings of cobra venom phospholipases A_2 to micelles of *n*-hexadecylphosphorylcholine. *J. Biochem.* **94**, 223-232
 - 76) Teshima, K., Ikeda, K., Hamaguchi, K. and Hayashi, K. (1981) Bindings of monodispersed *n*-alkylphosphorylcholines to cobra venom phospholipases A_2 . *J. Biochem.* **89**, 1163-1174
 - 77) Tomoo, K., Ohishi, H., Doi, M., Ishida, T., Inoue, M., Ikeda, K. and Mizuno, H. (1972) Interaction mode of *n*-dodecylphosphorylcholine, a substrate analogue, with bovine pancreas phospholipase A_2 as determined by X-ray crystal analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 821-827
 - 78) Tomoo, K., Ohishi, H., Ishida, T., Inoue, M., Ikeda, K., Sumiya, S. and Kitamura, K. (1994) X-ray crystal structure and molecular dynamics simulation of bovine pancreas phospholipase A_2 -*n*-dodecylphosphorylcholine complex. *Proteins* **19**, 330-339
 - 79) Noel, J. P., Bingman, C. A., Deng, T. L., Dupureur, C. M., Hamilton, K. J., Jiang, R. T., Kwak, J. G., Sekharudu, C., Sundaralingam, M. and Tsai, M. D. (1991) Phospholipase A_2 engineering. X-ray structural and functional evidence for the interaction of lysine-56 with substrates. *Biochemistry* **30**, 11801-11811
 - 80) Tomita, M., Taguchi, R. and Ikezawa, H. (1991) Sphingomyelinase of *Bacillus cereus* as a bacterial hemolysin. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **10**, 169-207
 - 81) Liu, B., Obeid, L. M. and Hannun, Y. A. (1997) Sphingomyelinases in cell regulation. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **8**, 311-322
 - 82) Tomita, M., Ueda, Y., Tamura, H., Taguchi, R. and Ikezawa, H. (1993) The role of acidic amino-acid residues in catalytic and adsorptive sites of *Bacillus cereus* sphingomyelinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1203**, 85-92
 - 83) Tamura, H., Tameishi, K., Yamada, A., Tomita, M., Matsuo, Y., Nishikawa, K. and Ikezawa, H. (1995) Mutation in aspartic acid residues modifies catalytic and haemolytic activities of *Bacillus cereus* sphingomyelinase. *Biochem. J.* **309**, 757-764
 - 84) Ikezawa, H., Tameishi, K., Yamada, A., Tamura, H., Tsukamoto, K., Matsuo, Y. and Nishikawa, K. (1995) Studies on the active sites of *Bacillus cereus* sphingomyelinase substitution of some amino acids by site-directed mutagenesis. *Amino Acids* **9**, 293-298
 - 85) Matsuo, Y., Yamada, A., Tsukamoto, K., Tamura, H., Ikezawa, H., Nakamura, H. and Nishikawa, K. (1996) A distant evolutionary relationship between bacterial sphingomyelinase and mammalian DNase I. *Protein Sci.* **5**, 2459-2467
 - 86) Tomiuk, S., Hofmann, K., Nix, M., Zumbansen, M. and Stoffel, W. (1998) Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: Functions in sphingolipid signaling? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3638-3643
 - 87) Weston, S. A., Lahm, A. and Suck, D. (1992) X-ray structure of the DNase I-d(GGTATACC) $_2$ complex at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **226**, 1237-1256
 - 88) Murakami, M., Iwama, S., Fujii, S., Ikeda, K. and Katsumura, S. (1997) An efficient synthesis of short-chain sphingomyelin analogs and their susceptibility to hydrolysis catalyzed by sphingomyelinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 1725-1728
 - 89) Barnholz, Y., Roitman, A. and Gatt, S. (1966) Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. II. Hydrolysis of sphingomyelin by an enzyme from rat brain. *J. Biol. Chem.* **241**, 3731-3737
 - 90) Chivers, P. T., Prehoda, K. E., Volkman, B. F., Kim, B.-M., Markley, J. L. and Raines, R. T. (1997) Microscopic pK_a values of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* **36**, 14985-14991
 - 91) Thornburg, L. D., Henot, F., Bash, D. P., Hawkinson, D. C., Bartel, S. D. and Pollack, R. M. (1998) Electrophilic assistance by asp-99 of 3-oxo- Δ^5 -steroid isomerase. *Biochemistry* **37**, 10499-10506
 - 92) Laura, R., Robison, D. J. and Bing, D. H. (1980) (*p*-Amidinophenyl)methanesulfonyl fluoride, an irreversible inhibitor of serine proteases. *Biochemistry* **19**, 4859-4864
 - 93) Abita, J. P., Lazdunski, M., Bonsen, P. P., Pieterse, W. A. and de Haas, G. H. (1972) Zymogen-enzyme transformations. On the mechanism of activation of pro-phospholipase A. *Eur. J. Biochem.* **30**, 37-47
 - 94) Donn -Op den Kelder, G. M., de Haas, G. H. and Egmond, M. R. (1983) Localization of the

- second calcium ion binding site in porcine and equine phospholipase A₂. *Biochemistry* **22**, 2470-2478
- 95) Krueger, W. C. and Pschigoda, L. M. (1971) Circular dichrometer calibration by Kramers-Kroening transform methods. *Anal. Chem.* **43**, 675-677
 - 96) Robles, E. C. and van den Berg, D. (1969) Synthesis of lecithins by acylation of O-(sn-glycero-3-phosphoryl)choline with fatty acid anhydrides. *Biochim. Biophys. Acta* **187**, 520-526
 - 97) Brockerhoff, H. and Yurkowski, M. (1965) Simplified preparation of L- α -glycerylphosphorylcholine. *Can. J. Biochem.* **43**, 1777
 - 98) Lo, T. -B. and Chang, W. -C. (1976) Phospholipase A from Formosan cobra (*Naja naja atra*) venom. in *Anim., Plant Microb. Toxins, Proc. Int. Symp., 4th* (Ohsaka, A., Hayashi, K. and Sawai, Y., eds.) Vol. 1, pp.191-203, Plenum Publishing, New York
 - 99) Kawauchi, S., Iwanaga, S., Samejima, Y. and Suzuki, T. (1971) Isolation and characterization of two phospholipase A's from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. *Biochim. Biophys. Acta* **236**, 142-160
 - 100) Takasaki, C., Suzuki, J. and Tamiya, N. (1990) Purification and properties of several phospholipases A₂ from the venom of Australian king brown snake (*Pseudechis australis*). *Toxicon* **28**, 319-327
 - 101) Wetlaufer, D. B. (1962) Ultraviolet spectra of proteins and amino acids. in *Advan. Protein Chem.* (Anfinsen, Jr. C. B., Anson, M. L., Bailey, K. and Edsall, J. T., eds.) Vol. 17, pp. 303-390, Academic Press, New York
 - 102) Dijkman, R., Dekker, N. and de Haas, G. H. (1990) Competitive inhibition of lipolytic enzymes. II. Preparation of 'monoacylamino' phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1043**, 67-74
 - 103) Katsumura, S., Iwama, S., Matsuda, T., Tani, T., Fujii, S. and Ikeda, K. (1993) Synthesis of oxazolidinone phospholipid analogue as a new inhibitor of phospholipase A₂. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **3**, 2703-2706
 - 104) de Haas, G. H., Postema, N. M., Nieuwenhuizen, W. and van Deenen, L. L. M. (1968) Purification and properties of an anionic zymogen of phospholipase A from porcine pancreas. *Biochim. Biophys. Acta* **159**, 118-129
 - 105) Cavins, J. F. and Friedman, M. (1970) An internal standard for amino acid analyses: S- β -(4-pyridylethyl)-L-cysteine. *Anal. Biochem.* **35**, 489-493
 - 106) Fiske, C. H. and Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**, 375-400
 - 107) Tomita, M., Nakai, K., Yamada, A., Taguch, R. and Ikezawa, H. (1990) Secondary Structure of sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *J. Biochem.* **108**, 811-815
 - 108) Yamada, A., Tsukagoshi, N., Udaka, S., Sasaki, T., Makino, S., Nakamura, S., Little, C., Tomita, M. and Ikezawa, H. (1988) Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for sphingomyelinase of *Bacillus cereus*. *Eur. J. Biochem.* **175**, 213-220
 - 109) Gal, A. E., Brady, R. O., Hibbert, S. R. and Pentchev P. G. (1975) Practical chromogenic procedure for the detection of homozygous and heterozygous carriers of Niemann-Pick disease. *N. Engl. J. Med.* **293**, 632-636
 - 110) Ikeda, K., Inoue, S., Amasaki, C., Teshima, K. and Ikezawa, H. (1991) Kinetics of the hydrolysis of monodispersed and micellar phosphatidylcholines catalyzed by a phospholipase C from *Bacillus cereus*. *J. Biochem.* **110**, 88-95